

# 1. Resumen

En este PFC se ha caracterizado la microestructura de un modelo sintético de hueso trabecular. Se trata de unas espumas comerciales rígidas de poliuretano que ofrecen propiedades más uniformes que las de un hueso natural y son ideales para realizar estudios de inyectabilidad de cementos óseos y de modelización de flujo, ya que permiten diseñar experimentos con un mejor control de las variables de influencia. El objetivo, por lo tanto, ha sido el de obtener información precisa sobre la microarquitectura de estas espumas utilizando técnicas de caracterización de SEM, CT y de  $\mu$ -CT. Con las imágenes de CT y de  $\mu$ -CT se han realizado reconstrucciones tridimensionales exportables a diversos programas de simulación computacional. Esta facilidad de manipulación permitirá en proyectos futuros analizar en 2D y 3D la conducción en medios porosos de fluidos newtonianos y no-newtonianos. Estos resultados son de interés en el tratamiento de fracturas vertebrales compresivas, tanto a nivel de materiales como de técnica quirúrgica.

El PFC contempla: a) el estado del arte de la aplicación clínica y de los materiales utilizados; b) el estudio histomorfológico del modelo poroso sintético; c) una comparativa de los resultados obtenidos frente a la literatura conocida; y d) el análisis de costes y de impacto medioambiental.

## *Abstract*

*The objective of this project was to characterize the microarchitecture of synthetic trabecular bone model made of solid rigid polyurethane foam. This is suitable model for a variety of applications requiring open cell structure, such as injection of cement and cancellous osteoporotic bone modeling. The model has been characterized by SEM, CT and  $\mu$ -CT. Both CT-images were also used to build up 3D reconstructions of the model for future computation of fluid flow through porous media. The project contains the: a) the state of the art of the main clinical application; b) the histomorphological study of foams; c) a discussion of the main results obtained; and d) the analysis of the cost and of the environmental impact.*



## Sumario

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. GLOSARIO</b>	<b>9</b>
2.1. Origen del proyecto.....	12
2.2. Motivación.....	12
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivos del proyecto .....	15
<b>4. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>17</b>
4.1. Definiciones y prerequisites .....	17
4.1.1. Estructura de un Hueso .....	17
4.1.2. Funciones y características mecánicas del tejido óseo.....	20
4.1.3. Estructura de una vértebra.....	20
4.1.4. Patología: la osteoporosis.....	22
4.1.5. Fractura por compresión de la vertebra (FCV).....	24
4.1.6. Tratamiento clínico de fracturas: Vertebroplastia y cifoplastia.....	26
4.1.7. Cementos existentes y propiedades requeridas .....	28
4.1.8. Propiedades requeridas para un cemento óseo inyectable .....	29
4.1.9. Características de los cementos de fosfato.....	31
4.1.10. Propiedades mecánicas de los cementos óseos .....	33
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
5.1. Presentación de las muestras.....	35
5.2. Análisis estructural de los modelos de hueso.....	37
5.2.1. Scanning Electron Microscopy (SEM).....	38
5.2.2. Tomografía CAT (tomografía asistida por ordenador).....	39
5.2.3. Micro tomografía (microCT) .....	41
5.3. Modelos tridimensionales .....	43
5.3.1. Obtención de modelos tridimensionales con varios software.....	43
5.3.2. Utilizaciones posibles de un modelo tridimensional .....	48
5.4. Tratamiento de imagen .....	48
5.4.1. Determinación de la porosidad .....	48

5.4.2. Caracterización microestructural y arquitectural.....	54
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>66</b>
6.1. SEM.....	66
6.1.1. Conclusiones .....	70
6.2. Tomografía CAT .....	71
6.3. Microtomografía .....	73
6.3.1. Tratamiento de imágenes .....	73
6.3.2. Definición de la porosidad .....	73
6.3.3. Determinación de la porosidad con <i>Micron Image Processing</i> .....	75
6.3.4. Determinación de la porosidad con ImageJ .....	77
6.3.5. Conclusiones .....	79
6.4. Parámetros microestructurales y arquitecturales .....	79
6.4.1. Comparaciones de parámetros entre las dos espumas .....	81
6.4.2. Comparación de los parámetros de microarquitecturas de las espumas con los de huesos reales .....	89
6.4.3. Conclusiones .....	91
<b>7. IMPACTO AMBIENTAL</b> .....	<b>92</b>
<b>8. COSTES</b> .....	<b>93</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>96</b>
<b>10. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>98</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>99</b>
11.1. Referencias bibliográficas .....	99



<b>Figura 1.</b> Ilustración de un hueso compacto y esponjoso. [6]	17
<b>Figura 2.</b> Organigrama de la composición de un hueso. [5]	18
<b>Figura 3.</b> Ilustración de los componentes de un hueso. [8]	19
<b>Figura 4.</b> Ilustración de los tipos de hueso. [5]	19
<b>Figura 5.</b> Vista axial de una vértebra. Se presentan las partes componentes de la misma (de referencia [10]). Imágenes Micro-CT (Scanco medical).	21
<b>Figura 6.</b> Sección sagital en una vértebra (de referencia [10]). Imágenes Micro-CT (Scanco medical).	21
<b>Figura 7.</b> Gráfico de previsión de fracturas a 50 años. [12]	22
<b>Figura 8.</b> Ilustración de la arquitectura de un hueso normal (izq.) y osteoporótico (der.). [8]	23
<b>Figura 9.</b> Ilustración de una fractura cuña anterior (izq.) y una fractura por estallido (der.). [14]	25
<b>Figura 10.</b> Ilustración del procedimiento de una vertebroplastia. [15]	26
<b>Figura 11.</b> Ilustración del procedimiento de una cifoplastia. [15]	27
<b>Figura 12.</b> Esquema de la elaboración de un cemento óseo.	32
<b>Figura 13.</b> Fotografía de los modelos de hueso de poliuretano.	35
<b>Figura 14.</b> Fotografía de una muestra conductora con depósito de oro	39
<b>Figura 15.</b> Fotografía de una muestra no-conductora	39
<b>Figura 16.</b> Imagen TAC con el software de conversión de imagen <i>MRicro</i> .	39
<b>Figura 17.</b> Imagen TAC con el software de conversión de imagen <i>MRicro</i> .	40



<b>Figura 18.</b> Obtención de un modelo tridimensional de la espuma azul (poro fino) con la opción <i>3D Viewer</i> de <i>ImageJ</i> .	41
<b>Figura 19.</b> Reconstrucción de tejido óseo mediante 3DDoctor. Microtomografía obtenidas a partir de la base de datos del software	42
<b>Figura 20.</b> Reconstrucciones tridimensionales de los modelos de espuma	42
<b>Figura 21.</b> Obtención de un modelo tridimensional de la espuma blanca (poro grueso) con la opción <i>3D Viewer</i> de <i>ImageJ</i>	43
<b>Figura 22</b> Tutorial <i>3D Doctor</i> selección de imágenes	44
<b>Figura 23.</b> Tutorial <i>3D Doctor</i> calibración de las imágenes	45
<b>Figura 24.</b> Tutorial 3D Doctor determinación de elementos	46
<b>Figura 25.</b> Tutorial 3D Doctor determinación de la ROI	46
<b>Figura 26.</b> Tutorial <i>3D Doctor</i> determinación del umbral	47
<b>Figura 27.</b> Tutorial 3D Doctor creacion de un modelo 3D	47
<b>Figura 28.</b> Tutorial ImageJ Selección de las imagenes	48
<b>Figura 29.</b> Tutorial ImageJ determinación de la escala de una imagen de micro CT	49
<b>Figura 30</b> Tutorial Imagen: Binarisacion de una imagen de microCT	49
<b>Figura 31.</b> Tutorial ImageJ Imagen antes y después la binarisacion	50
<b>Figura 32.</b> Tutorial ImageJ Imagen antes y después la limpieza	50
<b>Figura 33.</b> Tutorial ImageJ Operaciones preliminares al cálculo de la porosidad	51
<b>Figura 34.</b> Tutorial ImageJ Imagen cuyas partículas están analizadas por " <i>particule analyzer</i> "	52
<b>Figura 35.</b> Tutorial ImageJ Resultados " <i>particule analyzer</i> "	53
<b>Figura 36.</b> Representación de Tb.Th por <i>BoneJ</i>	56



<b>Figura 37.</b> Forma gráfica de representar el valor de la separación trabecular (Tb.Sp) y espesor trabecular (Tb.Th).	58
<b>Figura 38.</b> Esquema ilustrando las nociones de Sp.Tb y Tb.Th	59
<b>Figura 39.</b> Esquema ilustrando el método de MIL	60
<b>Figura 40.</b> Dimensión fractal [23]	63
<b>Figura 41.</b> Tutorial <i>BoneJ</i> Imagen binarisada antes y después el “ <i>skeletonize</i> ”	64
<b>Figura 42.</b> Tutorial <i>BoneJ</i> Opciones a disposición por <i>BoneJ</i>	65
<b>Figura 43.</b> Imágenes de SEM de las espumas de poliuretano	66
<b>Figura 44.</b> Establecimiento de la escala de una imagen SEM	67
<b>Figura 45</b> Dibujo de un poro con <i>ImageJ</i> sobre una imagen de SEM	68
<b>Figura 46</b> Medición de la separación trabecular sobre imagen de SEM	69
<b>Figura 47.</b> Imágenes de TAC de la espuma blanca	72
<b>Figura 48.</b> Imágenes TAC de la espuma azul	72
<b>Figura 49.</b> Esquema de los tipos de porosidad	74
<b>Figura 50.</b> Imagen de TAC de una espuma	76

<b>Tabla 1.</b> Propiedades mecánicas de cerámicas de fosfato de calcio y de hueso [21] __	34
<b>Tabla 2.</b> Propiedades mecánicas y densidad de las espumas de poliuretano [23] ____	36
<b>Tabla 3.</b> Medición de la porosidad de una imagen de microCT _____	53
<b>Tabla 4.</b> Superficie de los poros de las espumas (SEM) _____	68
<b>Tabla 5.</b> Parámetro de Sp.Th de las dos espumas (SEM) _____	69
<b>Tabla 6.</b> Parametro Tb.Th de las dos espumas (SEM) _____	70
<b>Tabla 7.</b> Porosidad de las dos espumas medida con <i>Micron Image Processing</i> _____	76
<b>Tabla 8.</b> Porosidad de las dos espumas medida con “ <i>particle analyzer</i> ” _____	77
<b>Tabla 9.</b> Porosidad de las dos espumas medida con <i>BoneJ</i> _____	78
<b>Tabla 10.</b> Comparación de las porosidades medidas con varios métodos _____	78
<b>Tabla 11.</b> Parámetros BV, TV, BS para la espuma blanca _____	81
<b>Tabla 12.</b> Parámetros BV, TV, BS para la espuma azul medidos con <i>BoneJ</i> _____	81
<b>Tabla 13.</b> Parámetro de Tb.Th para espuma azul medido con <i>BoneJ</i> _____	82
<b>Tabla 14.</b> Parámetro Tb.Th de la espuma azul medido con <i>BoneJ</i> _____	82
<b>Tabla 15.</b> Comparación de los Tb.Th obtenidos con varios métodos _____	83
<b>Tabla 16.</b> Parámetro Sp.Tb de la espuma blanca medido con <i>BoneJ</i> _____	84
<b>Tabla 17.</b> Parámetro Sp.Tb de la espuma blanca medido con <i>BoneJ</i> _____	84
<b>Tabla 18.</b> Comparación del Tb.Sp obtenido con varios métodos _____	85
<b>Tabla 19.</b> . Parámetro de dimensión fractal de las dos espumas medido con <i>BoneJ</i> __	85
<b>Tabla 20.</b> Parámetro de densidad de conectividad de las dos espumas medido por <i>BoneJ</i> _____	86



<b>Tabla 21.</b> Parámetros de vectores propios, SMI y DA de la espuma blanca medidos con <i>BoneJ</i>	87
<b>Tabla 22.</b> Parámetros de vectores propios, SMI y DA de la espuma azul medidos con <i>BoneJ</i>	87
<b>Tabla 23.</b> Parámetro Tb.N de las dos espumas medido con <i>BoneJ</i>	88
<b>Tabla 24.</b> Comparación de parámetros de espumas vs. hueso trabecular [22]	90
<b>Tabla 25.</b> Comparación de la dimensión fractal de las espumas con datos de huesos trabeculares	90

## 2. Glosario

**Voxel.** Píxel volumétrico.

**Epífisis.** Cada uno de los extremos de un hueso largo. Es la zona en la que se sitúan las articulaciones.

**Hidroxiapatita.** Componente inorgánico ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Generalmente se requiere de un injerto o sustituto óseo para ayudar o completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y así restaurar la función normal del tejido. Los biomateriales pueden utilizarse como sustitutos de injerto de hueso autólogo. Dentro de las cerámicas utilizadas se encuentra la hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_x(\text{HPO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ , principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados.

**Colapso.** Es una fractura espontanea.

**Cifosis.** Deformación de la columna vertebral que produce su curvatura en 45 grados o más perdiendo parte o toda su habilidad para moverse hacia dentro.

**ASBMR.** “*American Society for Bone and Mineral Research*”. Es una sociedad profesional, científica y médica que participa en el estudio del metabolismo óseo y mineral. [1]

**Espesor cortical.** Espesor de los tramos del hueso cortical.

**Ash density.** Es un indicador del contenido mineral del tejido óseo. Su valor informa sobre la rigidez y resistencia del tejido óseo.

**Histomorfología.** Es el estudio de la geometría de los tejidos.

**Biocompatibilidad.** Tolerancia biológica de cualquier biomaterial caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación, así como de efectos nocivos sobre tejidos distantes.

**Extravasación.** Escape del cemento óseo inyectado o implantado hacia lugares exteriores a la implantación.

**Bioactividad.** Capacidad de un material para inducir, estimular o modular una acción biológica definida en el tejido receptor. Así, un material bioactivo es aquel que posibilita una



respuesta biológica específica en su interfaz con los tejidos, favoreciendo el enlace de ambos. [2]

**Hematopoyesis.** La hematopoyesis o hemopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formadores de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética pluripotencial o *Stem Cell*. Las células madre que en el adulto se encuentran en la médula ósea y son las responsables de formar todas las células y derivados celulares que circulan por la sangre. [3]

**BV/TV.** “*Bone volumen/Tissue volumen*”. Es la proporción de volumen de hueso respecto al volumen total.

**FVC.** Fractura vértebra por compresión.

**CP.** Cifoplastia; técnica de inyección de cemento óseo de mínima invasión.

**VP.** Vertebroplastia; técnica de inyección de cemento óseo de mínima invasión..

**CaF.** Fosfato de calcio.

**PMMA.** Polimetilmetacrilato.

**CFC.** Cemento de fosfato de calcio.

**SEM.** “*Scanning electron microscopy*”.

**STL.** El formato de fichero *STL* es un formato utilizado en el *software* de estereolitografía. Este formato fue desarrollado por *3D Systems*. Un fichero *STL* sólo describe la geometría de la superficie de un objeto en tres dimensiones. Este formato no incluye información sobre color, textura u otros parámetros habituales de un modelo de diseño asistido por ordenador. Su principal aplicación permite crear modelos tridimensionales reales mediante el uso de máquinas de prototipado rápido.

**TAC.** “*Tomography assisted by computer*”. Tomografía asistida por ordenador o tomografía computarizada: técnica que permite tomar imágenes de la sección transversal de un cuerpo. Se utiliza para detectar fracturas, lesiones e infecciones en la columna vertebral.

**VOI.** “*Volumen of interest*”. Volumen de interés o volumen utilizado en el estudio durante un tratamiento de imagen.

**BV.** “*Bone volumen*”. Volumen de hueso.

**TV.** “*Total or tissue Volume*”. Es el volumen total de la muestra en la que se consideran los espacios internos.

**SMI.** “*Structure model index*” o índice de la estructura del modelo. Modelo matemático que permite saber si la geometría de la estructura trabecular se puede asimilar a una forma de placa o de viga.

**Tb.Th.** “*Trabecular thickness*” o espesor de los tramos de un hueso.

**TbSp.** “*Trabecular space*” o separación de los tramos. Es la longitud medida entre dos tramos que rodea un poro.

**d<sub>f</sub>.** Dimensión fractal.

**DA.** “*Degree of anisotropy*” o Grado de anisotropía (DA). Es una medida del grado de orientación de una subestructura dentro de un volumen. El hueso trabecular varía su orientación en función de la carga mecánica y puede llegar a ser anisotrópico. Este *plugin* utiliza la longitud de intercepción media (*MIL*) o el método que permite determinar la anisotropía de la muestra.

**MIL method.** “*Mean intercept Length*” o método de la longitud de intercepción media. Este método inserta de manera aleatoria líneas en una imagen binarizada y cuenta el número de veces que las líneas cortan a la parte sólida. Se utiliza para medir la anisotropía.

**Conn.D.** Es la densidad de conectividad. Hueso trabecular es una de esas redes, y su densidad de conectividad (Conn.D) se puede calcular dividiendo la estimación de la conectividad por el volumen de la muestra.

**Un esferoide prolato.** Es un esferoide en el cual su eje polar es mayor que su diámetro ecuatorial. Por ejemplo un balón de Rugby. [4]

**Un esferoide oblato.** Es un elipsoide rotacionalmente simétrico en el cual sus ejes polares son más pequeños que el círculo de su diámetro ecuatorial. Por ejemplo la Tierra. [4]



## 2.1. Origen del proyecto

Los objetivos planteados en este proyecto forman parte de un proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación en la convocatoria del año 2010, titulado “BIOMATERIALES PARA CEMENTACION Y RESTAURACION DE HUESO OSTEOPOROTICO”. Se trata de un proyecto multidisciplinar donde colaboran profesores de los Departamentos de Ciencia de los Materiales (ETSEIB-UPC), Física Aplicada (EUETIB-UPC) y Mecánica de Fluidos (EUETIB-UPC). El objetivo general de dicho proyecto es entender las características de flujo de materiales tipo cemento en un medio poroso como el hueso trabecular.

Por este motivo, se plantea en este PFC la necesidad y la conveniencia de caracterizar la microestructura de modelos sintéticos de hueso que puedan utilizarse en etapas posteriores para computar las características de flujo de diversos medios materiales.

## 2.2. Motivación

En este proyecto se van a caracterizar espumas rígidas de poliuretano que se comercializan como modelos sintéticos de hueso trabecular normal y osteoporótico, sobre las que no hay datos de caracterización fiables. Se han escogido estas espumas debido a su disponibilidad y reproducibilidad de escala ya que con un control preciso de los factores de proceso se obtienen microarquitecturas promedio óptimas que aseguran la reproducibilidad de los experimentos, ya sea de obtención de propiedades mecánicas como de análisis de flujo. Desde este punto de vista, es importante traducir las características intrínsecas de estos sólidos celulares a modelos paramétricos y geométricos fácilmente computables que permitan estudios más complejos de transporte de flujo. Se espera que este planteamiento permitirá entender y desarrollar mejoras en las técnicas de mínima invasión que se utilizan actualmente en el tratamiento de fracturas vertebrales compresivas, como son la vertebroplastia (VP) y la cifoplastia (CP) que consisten en la inyección a través de una cánula de un cemento óseo de características particulares en el interior de una vértebra dañada de estructura porosa.

Por otra parte, desde un punto de vista formativo, el presente PFC ha permitido acercarse al estudio de los sólidos celulares, tan presentes hoy en día en muchas aplicaciones



tecnológicas, desde varias técnicas de caracterización de análisis de imagen (CT y  $\mu$ -CT) que permiten crear modelos tridimensionales fácilmente exportables a programas de computación y de uso en procesos de prototipado rápido. La posibilidad de virtualizar una estructura material compleja y de analizar su comportamiento real por métodos numéricos es en sí misma de una gran motivación.





### 3. Introducción

#### 3.1. Objetivos del proyecto

El presente proyecto pretende estudiar las características microestructurales de un modelo sintético de hueso compuesto de matriz de poliuretano con fibras de vidrio (sólido celular). Se trata de un modelo comercial del que no se disponen datos fiables de su estructura y propiedades pero que tiene un interés creciente como material in vitro en estudios de inyectabilidad en tejido óseo osteoporótico.

El objetivo general del proyecto es evaluar y definir los principales aspectos estructurales que definen tridimensionalmente el modelo de espuma para llegar a conocer y cuantificar, en un futuro cercano, la arquitectura tridimensional del hueso trabecular o esponjoso y así definir su comportamiento mecánico a compresión. Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar la microestructura de espumas de poliruretano mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Tomografía Computerizada (CT) y micro-CT ( $\mu$ -CT).
2. Reconstruir modelos 2D y 3D a partir de la caracterización CT y  $\mu$ -CT.
3. Comparar los resultados obtenidos con los de otros autores.

Para ello se obtendrá información paramétrica histomorfológica de la microestructura y se estudiará la fiabilidad de *software* libre (*ImageJ* y *BoneJ*) tanto desde un punto de vista del estudio paramétrico como de reconstrucción 2D y 3D de imágenes exportables a software de computación para análisis posterior.





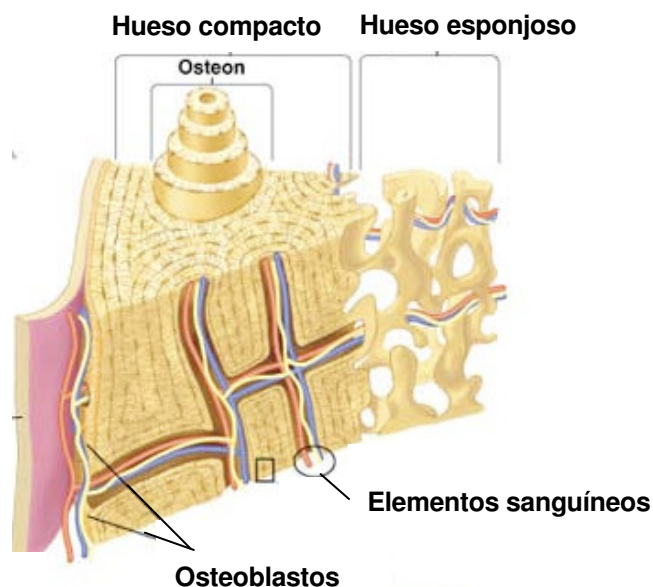
## 4. Estado del arte

### 4.1. Definiciones y prerequisites

#### 4.1.1. Estructura de un Hueso

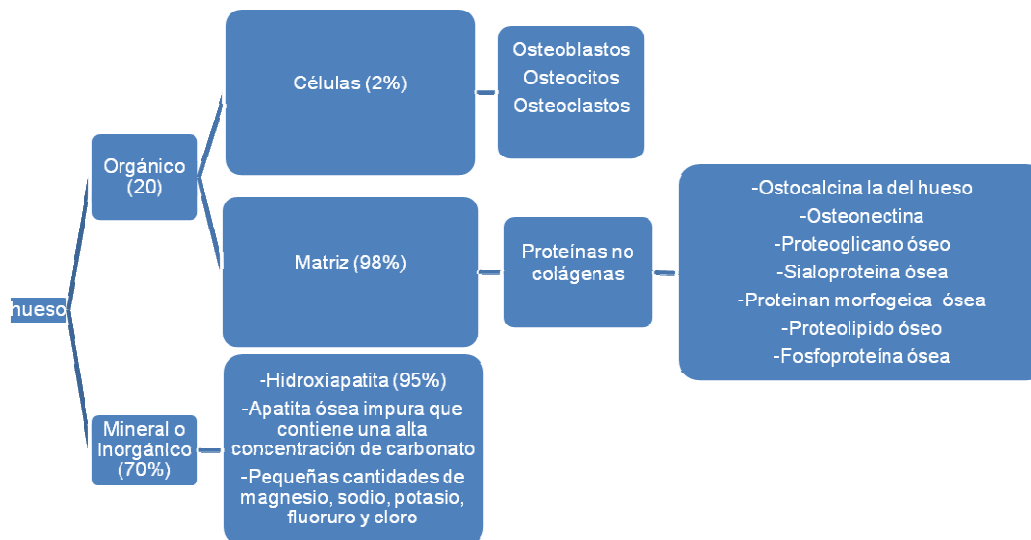
El hueso es un material compuesto (Fibras de Colágeno, cristales de apatita y agua) y el único tejido conectivo duro. Tiene como principal componente el hidroxiapatita (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [3]. El hueso trabecular y el hueso compacto combinan una fase orgánica (principalmente las fibras de colágeno) que representa el 30% del peso del hueso y una fase mineral (70% del peso del hueso) que consiste en cristales de calcio. El tejido óseo es un tipo de tejido conjuntivo caracterizado por un gran contenido en sales de fosfato de calcio. Alrededor del 25% del tejido óseo es agua, un 25% son fibras proteínicas como el colágeno y el 50% restante es una mezcla de sales minerales de fosfato de calcio. [5]

Se distinguen dos tipos de tejido óseo: compacto y esponjoso. El hueso compacto está constituido de anillos concéntricos de matriz ósea que rodean los canales que alojan los vasos sanguíneos (Figura 2). El hueso esponjoso se parece a una “esponja” con bastantes huecos. Estos espacios están rellenos de médula ósea (Figura 2).



**Figura 1.** Ilustración de un hueso compacto y esponjoso. [6]



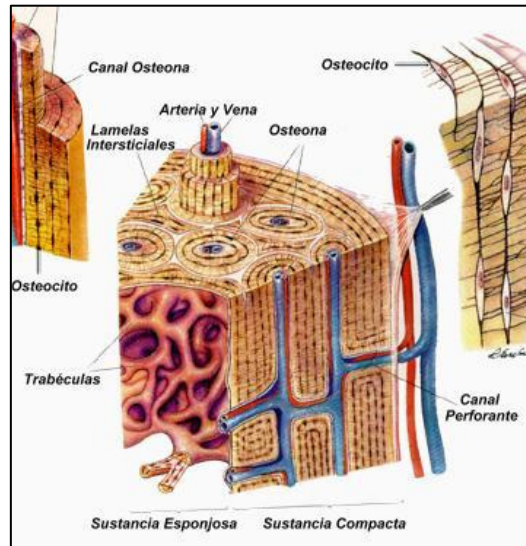


**Figura 2.** Organigrama de la composición de un hueso. [5]

El hueso está formado por dos tipos de estructuras: el hueso cortical y el hueso trabecular (Figura1). La capa externa dura de los huesos está compuesta de tejido óseo compacto, así llamado debido a sus pocos espacios vacíos. Su porosidad es de 5.30% como valor promedio y según algunos autores [7]. Este tejido da a los huesos su aspecto liso, blanco y sólido, y representa el 80% de la masa ósea total de un esqueleto adulto. El hueso compacto es también el hueso más denso.

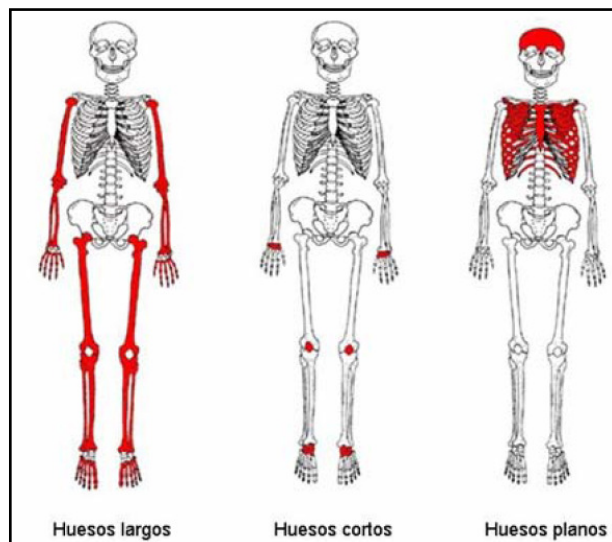
El hueso trabecular es un tejido fino que llena el interior del hueso y ocupa el interior de las vértebras, huesos planos y las extremidades de los huesos largos. Tiene una porosidad abierta. También se denomina hueso esponjoso. Se compone de una red de unidades estructurales básicas en forma de barras y de placas que hacen el hueso más ligero y dejan espacios para los vasos de sangre y la médula. El hueso trabecular óseo representa 20% de la masa ósea total, pero representa cerca de diez veces la superficie del hueso compacto. Su porosidad es 30-90% según algunos autores [3]. Si por cualquier razón hay una alteración en la tensión a que está sometido el tejido esponjoso, hay un reordenamiento de las trabéculas. La diferencia microscópica entre el hueso compacto y esponjoso es que el hueso compacto se compone de los sitios haversianos y osteonas, mientras que los huesos esponjosos no. Actúa como un amortiguador a través de la columna vertebral. Las paredes de estas se deterioran con la edad. La perforación y el corte de las trabéculas junto con el adelgazamiento de las mismas son los principales procesos de degradación a los que están sometidas.

Además, el tejido óseo trabecular es muy sensible a las variaciones metabólicas. La pérdida ósea asociada con el envejecimiento conduce a una reducción del 35% de la masa ósea cortical y el 50% de la masa ósea trabecular en la mujer. Por este motivo los estudios de refuerzo de los huesos centran su interés en el hueso trabecular. [8]



**Figura 3.** Ilustración de los componentes de un hueso. [8]

Hay tres tipos de hueso (Figura 3): Los huesos largos (fémur, tibia), los huesos cortos y los huesos planos (escápula, cráneo y mandíbula).



**Figura 4.** Ilustración de los tipos de hueso. [5]



#### 4.1.2. Funciones y características mecánicas del tejido óseo

Las principales funciones y características mecánicas del tejido óseo son:

1. Función biológica o de regulación del metabolismo de ciertos iones (Ca, Na, H, Mg, P) y de producción de células sanguíneas (Hematopoyesis).
2. Función mecánica de protección de algunos órganos (cráneo, columna, tórax y pelvis) y de estabilizar y permitir movilidad. [5]
3. Función de almacenamiento de grasa (médula ósea) y minerales (Ca) y de formación de células (glóbulos rojos y blancos).

La organización longitudinal de las osteonas proporciona resistencia a la flexión. La orientación de las fibras de colágeno permite tracción y cortante.

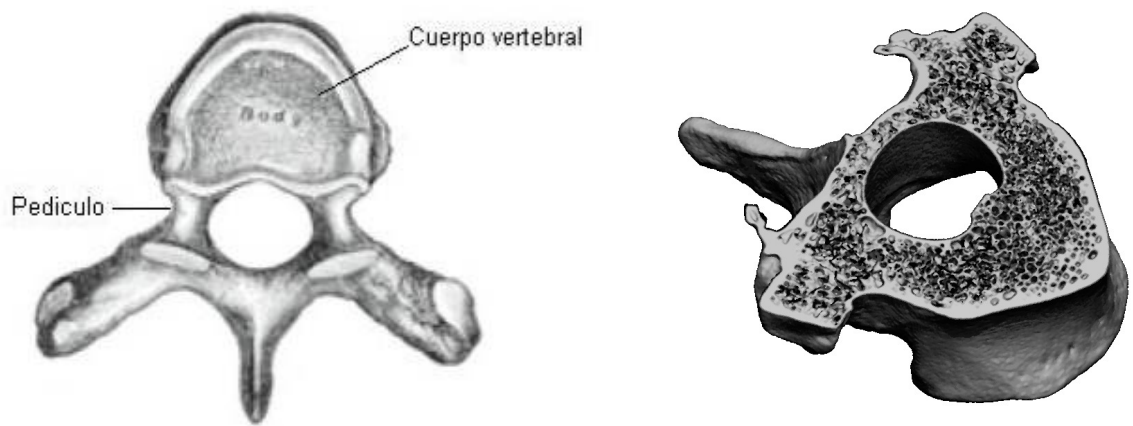
En el hueso esponjoso, las trabéculas se organizan adecuadamente para soportar mejor las tensiones de flexión, tracción y compresión.

El hueso es capaz de rediseñarse con procesos de deposición y reabsorción de tejido óseo. Hay dos mecanismos de regulación de la reorganización: 1) Regulación hormonal de paratiroidea (PTH; responsable de la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  en sangre) y de calcitonina (responsable del aumento de la concentración de calcio); y 2) Reorganización por tensión mecánica (*Ley de Wolf*).

#### 4.1.3. Estructura de una vértebra

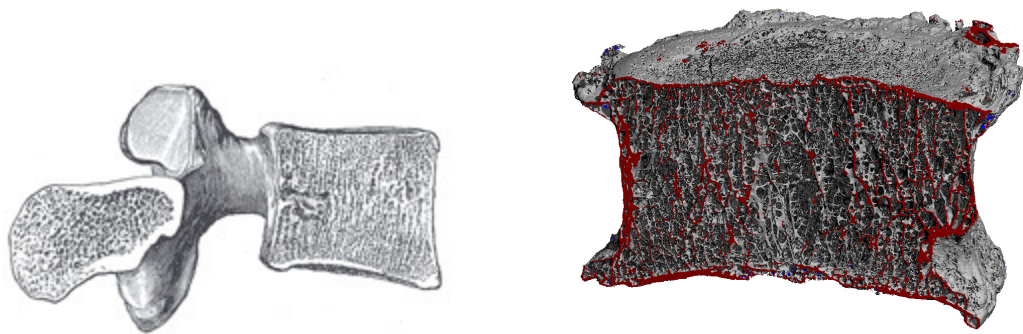
Una vértebra típica consta de dos partes esenciales: un segmento anterior, el cuerpo vertebral, y una parte posterior, el arco vertebral. Estas dos partes adjuntas delimitan el foramen (agujero) vertebral. El arco vertebral consta de un par de pedículos y un par de láminas, y apoya las apófisis vertebrales (cuatro articulares, dos transversales, y una espinosa). El cuerpo vertebral es la parte principal de una vértebra, y es más o menos en forma cilíndrica. La superficie anterior presenta algunas pequeñas aberturas, para el paso de los vasos de nutrición; en la superficie posterior hay sólo una única apertura amplia e irregular, o en ocasiones más de una, para la salida de las venas basi-vertebrales del cuerpo vertebral. [9]





**Figura 5.** Vista axial de una vértebra. Se presentan las partes componentes de la misma (de referencia [10]). Imágenes Micro-CT (Scanco medical).

Desde el punto de vista estructural, el cuerpo vertebral se compone de tejido esponjoso, cubierto por una fina capa de hueso compacto; este último es perforado por numerosos orificios, algunos de gran tamaño para el paso de los vasos. El interior del hueso es atravesado por uno o dos grandes canales, para la recepción de las venas, que convergen hacia una única apertura grande e irregular, o varias pequeñas aperturas, situadas en la parte posterior del cuerpo vertebral (Figura 6).

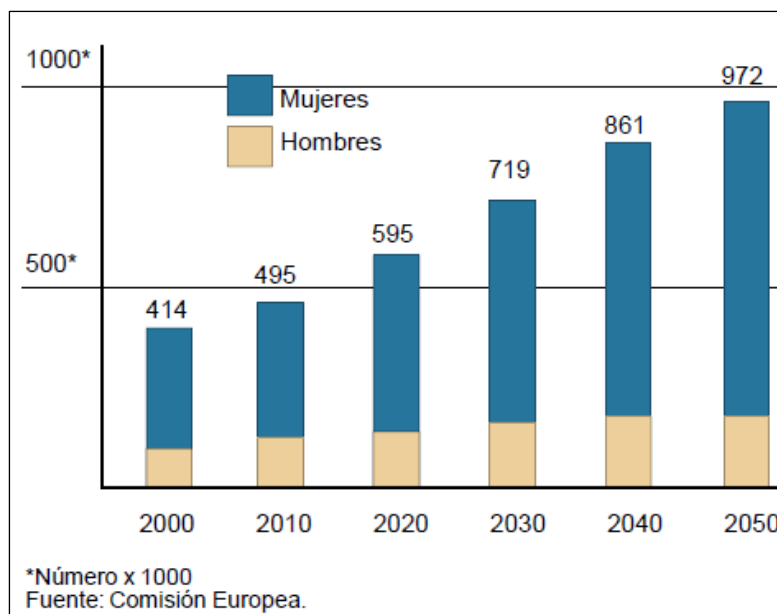


**Figura 6.** Sección sagital en una vértebra (de referencia [10]). Imágenes Micro-CT (Scanco medical).

#### 4.1.4. Patología: la osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad muy común en la población adulta. Cerca de tres millones de personas tienen esta enfermedad en España, la mayoría de las cuales son mujeres. Aproximadamente 30 de cada 100 mujeres sufren de osteoporosis después de la menopausia. Cada año, la osteoporosis causa más de 1,3 millones de fracturas de vértebras, cadera y muñecas en el mundo. Las fracturas más graves son las fracturas de cadera. La mayoría de ellas requieren una intervención quirúrgica delicada y costosa que no garantiza la recuperación perfecta del paciente. Se sabe que las fracturas causadas por osteoporosis tienen, en España, un coste hospitalario considerable [11].

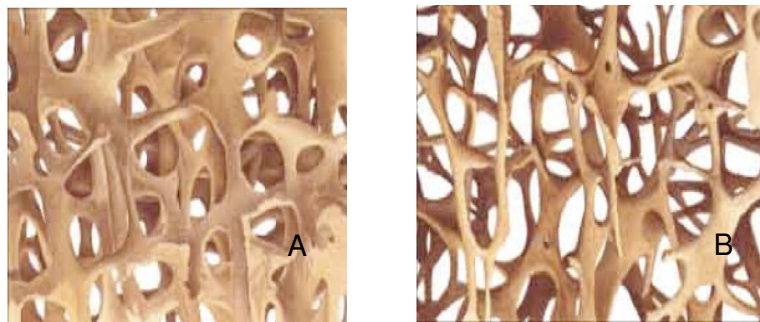
Los costes directos hospitalarios de la Unión Europea se estimaron en 4.800 millones de euros en el año 2000. Se calculó que los costes totales de España fueron alrededor de 220 millones de euros en el mismo año. El impacto económico de este problema de salud pública se espera que aumente a medida que envejece la población. Se espera que para 2050 los costes de esta enfermedad superen 132.000 millones de euros en la Unión Europea [12]. El gráfico de abajo pone en evidencia el aumento de los casos de fractura de cadera cuya mayoría ocurren por osteoporosis.



**Figura 7.** Gráfico de previsión de fracturas a 50 años. [12]

La osteoporosis es una enfermedad que resulta en una pérdida de densidad ósea normal, la masa y la fuerza, lo que lleva a una condición en la cual los huesos son cada vez más porosos y vulnerables a la rotura. Las vértebras también pueden llegar a ser debilitados por cáncer. La osteoporosis es una disminución de la masa ósea acompañada de cambios en la microarquitectura que conducen a un aumento inaceptable del riesgo de fractura. La osteoporosis puede ocurrir en mujeres con un pico de masa ósea baja o en mujeres con alta pérdida de hueso (posmenopáusicas). Además de la menopausia, el envejecimiento y la herencia son los factores de mayor riesgo.

El **Pico de masa ósea** (*PMO*) llega al final de la adolescencia y es uno de los factores primordiales que determinarán la mineralización del esqueleto y, en consecuencia, el riesgo de fractura osteoporótica. Estos son los factores genéticos que determinan 80% del riesgo de osteoporosis, el restante 20% están relacionados con factores ambientales (dieta, ejercicio, ambiente hormonal). El ejercicio regular es favorable a la remodelación ósea: la tensión en los tendones y el aumento de la masa muscular induce cambios positivos en la actividad ósea. Del mismo modo, la vitamina D juega un papel esencial en la absorción de calcio y mantiene el equilibrio del calcio. Pero la detención de secreción de estrógeno es responsable de la mayoría de la pérdida de masa ósea que experimenta una mujer durante su vida. La terapia hormonal sustitutiva (THS) es capaz de detener la pérdida ósea y, por tanto, reducir el riesgo de osteoporosis y fracturas. [2] La osteoporosis aumenta la porosidad del hueso de forma alarmante (Figura 8).



**Figura 8.** Ilustración de la arquitectura de un hueso normal (izq.) y osteoporótico (der.). [8]



#### 4.1.5. Fractura por compresión de la vértebra (FCV)

Cuando en una vértebra ocurre una fractura, el hueso se comprime y distorsiona, causando dolor. Estas fracturas por compresión, que pueden implicar el colapso de una o más vértebras de la columna, son un síntoma común y el resultado de la osteoporosis.

En Europa, la incidencia de fracturas vertebrales se ha incrementado desde 300 hasta 400% para las mujeres y más de 400% para los hombres durante los últimos 30 años [1]. Estos datos están ajustados por edad e indican que existe una disminución de la masa ósea o la calidad del hueso de generación en generación. Para detener o revertir el aumento de las fracturas osteoporóticas deben establecerse regímenes generales de prevención. Sin embargo, para ello, la comprensión básica de los cambios relacionados con la edad en la calidad de los materiales, la arquitectura 3D del hueso esponjoso, macro-estructura (forma y tamaño), y la fuerza del hueso vertebral es crucial. Además, es esencial establecer relaciones entre la microarquitectura 3D del hueso esponjoso, la masa ósea y la resistencia ósea [5]. Se debe notar que la resistencia del cuerpo vertebral humana está determinada por varios factores importantes como el área del cuerpo vertebral transversal, el espesor del borde cortical, el espesor de las placas terminales (*endplates*), y la densidad, junto con la micro arquitectura 3D de la red trabecular central [13].

En la **tabla 1** se indican los principales parámetros que se degradan con la edad y empeoran con la osteoporosis. Como puede verse en la tabla la relación BV/TV disminuye con la edad y con la osteoporosis. El mismo comportamiento se observa con el parámetro *Ash density*, el espesor cortical y la resistencia a la carga. La disminución de las propiedades mecánicas del tejido óseo trabecular de la vértebra es consecuencia de la disminución del espesor trabecular y de la rotura de algunas de las trabéculas.

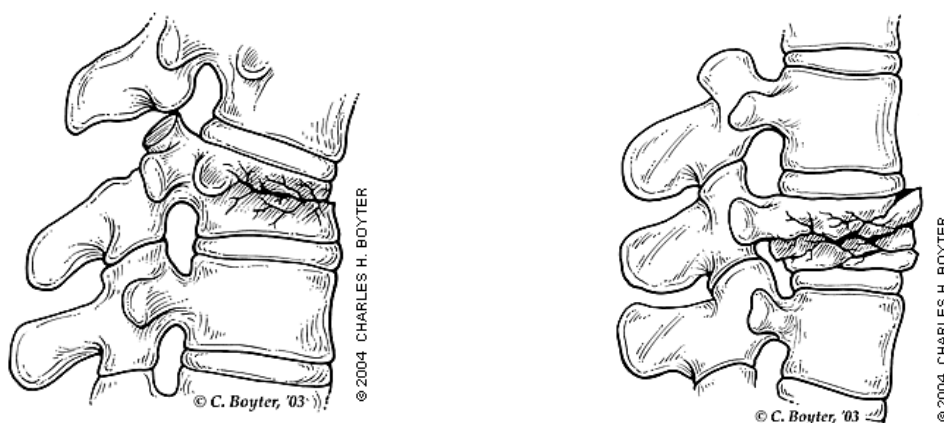
Las fracturas de compresión vertebral son menos costosas en comparación con las fracturas de cadera. Sin embargo, las fracturas vertebrales por compresión provocan un dolor agudo y crónico en el paciente que reduce considerablemente su calidad de vida.

La fuerza aplicada por lo general hace que la parte anterior del cuerpo vertebral quede aplastada formando una fractura en cuña anterior (Figura 10). La columna central se mantiene intacta. Esto se traduce en la pérdida de la altura anterior de la vértebra mientras que la altura posterior se mantiene sin cambios. A medida que se produce el colapso de las

vértebras anteriores, la columna se inclina hacia delante, provocando una deformidad cifótica (deformación de la columna vertebral). Debido a que la mayoría de daños se limita a la columna vertebral anterior, la fractura suele ser estable y rara vez se asocian con problemas neurológicos. Una fractura se considera "fractura por estallido" si se rompe el cuerpo vertebral (Figura 9). [14]

Edad	20-40	70-80	Osteoporótico
BV/TV	15-20	8-12	4-8
Ash density g/cm <sup>3</sup>	0.200-0.250	0.100-0.0150	0.060-0.090
Espesor cortical $\mu\text{m}$	400-500	200-300	120-150
Carga rotura kg	1000-1200	150-250	60-150
Carga rotura cortical rim % total	25-30	70-80	80-90

**Tabla 1.** Datos característicos de una vértebra humana en relación con la edad. [13]



**Figura 9.** Ilustración de una fractura cuña anterior (izq.) y una fractura por estallido (der.). [14]

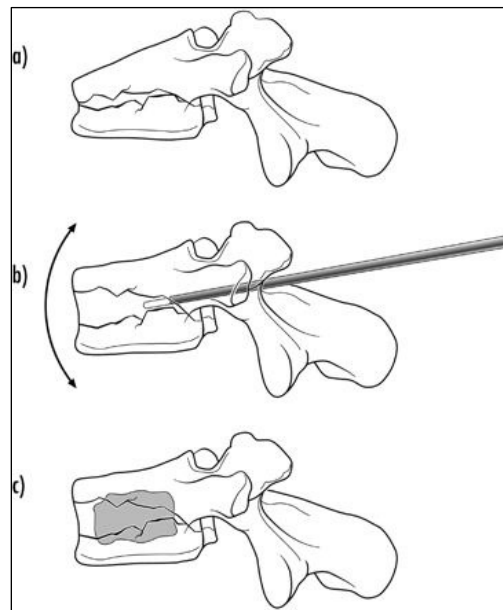


#### 4.1.6. Tratamiento clínico de fracturas: Vertebroplastia y cifoplastia

La vertebroplastia (VP) y la cifoplastia (CP) son procedimientos de mínima invasión para tratar fracturas vertebrales por compresión (FVC).

##### 4.1.6.1. Vertebroplastia

La VP se propuso para calmar el dolor del colapso vertebral. Este método consiste en la inyección de cemento en el hueso trabecular. Pretende reforzar la vértebra colapsada. La Figura 10 ilustra este procedimiento.



---

**Figura 10.** Ilustración del procedimiento de una vertebroplastia. [15]

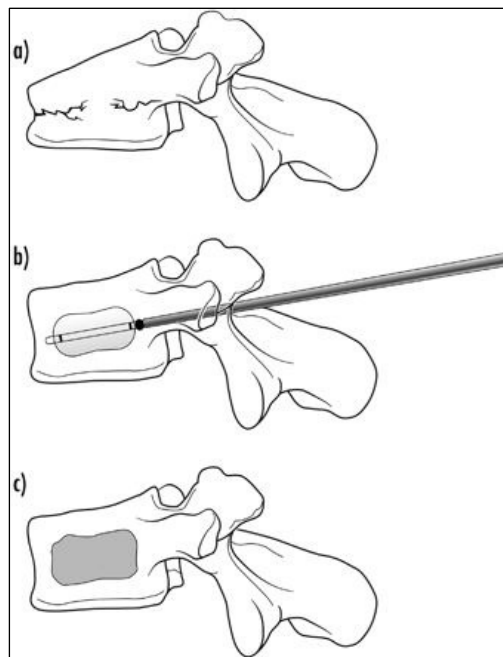
**a:** Un cuerpo vertebral fracturado con una hendidura intravertebral móvil.

**b:** Con anestesia local, se inserta una cánula (localización visual por rayos-X) a través de una pequeña incisión. Esta técnica permite realizar biopsias del tejido dañado

**c:** El área debilitada se rellena con cemento óseo para estabilizar la fractura. Una vez llena, se retira la cánula. El cemento se endurece y estabiliza el cuerpo vertebral; se recupera la movilidad y se alivia el dolor. [15]

#### 4.1.6.2. Cifoplastia

La CP persigue los mismos objetivos que la VP, calmar el dolor, restaurar la altura del cuerpo vertebral y mejorar así la cifosis secundaria. El principio consiste en introducir, por el trocar en el cuerpo vertebral, un balón inflable. Este globo permite crear una cavidad donde será más fácil, con un menor riesgo de incumplimiento, de inyectar el cemento. Por otra parte, este globo debe permitir una expansión de la vértebra. [15] Recuperación de la altura de la vértebra en la cifoplastia.



**Figura 11.** Ilustración del procedimiento de una cifoplastia. [15]

**a:** Vértebra fracturada con pérdida de altura.

**b:** A través de una incisión de media pulgada, pequeños instrumentos se colocan en el cuerpo vertebral fracturado para crear un canal de trabajo. Un dispositivo con balón se coloca en la fractura. El dispositivo se infla, creando una cavidad en el interior del cuerpo.

**c:** Tras la retirada del globo se inyecta cemento óseo en el espacio vacío para estabilizar la fractura. Una vez llenos, los instrumentos se extraen y se cierra la incisión.



#### **4.1.6.3. Riesgo**

Extravasación de cemento, es decir que una pequeña cantidad del cemento ortopédico podría salirse del cuerpo vertebral. Por lo general esto no es problemático, a menos que la fuga vaya a un lugar potencialmente peligroso como el conducto vertebral.

Incremento de la incidencia de fracturas vertebrales adyacentes a la vértebra donde se realiza la técnica. No se sabe si la nueva fractura es debida a la técnica o a la enfermedad. Es más frecuente en la vertebroplastia, debido al mayor riesgo de extravasación de cemento. Suele ocurrir entre 1-1,5 meses tras la técnica.

En menor frecuencia la irritación térmica causada por el calor del cemento (el efecto de “lavado” del líquido cefalorraquídeo lo minimiza), fiebre transitoria, espondilitis, fístulas de líquido cefalorraquídeo o rotura del pedículo [15].

#### **4.1.7. Cementos existentes y propiedades requeridas**

##### **4.1.7.1. Cemento de poli (metacrilato de metilo)**

PMMA (poli metacrilato de metilo) es el producto que se utiliza normalmente como el cemento para estos tratamientos, pero recientemente, los estudios se realizan para desarrollar un nuevo cemento de cemento de fosfato de calcio.

Los cementos minerales óseos, tales como el carbonato de calcio y cementos CaP tienen un tiempo de trabajo más importante es decir que el tiempo de fraguado es suficientemente lento para dejar más tiempo al médico para prepararlo y un efecto térmico bajo. También son biodegradables, mientras que tiene una buena resistencia mecánica. Sin embargo, la viscosidad de los cementos minerales inyectables es alta, y la infiltración de estos cementos en el cuerpo vertebral se ha cuestionado. Recientemente, las propiedades de infiltración de un cemento de CaP han mejorado considerablemente, lo cual es ideal para la inyección transpedicular a los cuerpos vertebrales de la vertebroplastia o el aumento de la fuerza del cuerpo vertebral osteoporótico. [17]



#### 4.1.7.2. **Cemento de fosfato calcio (CFC)**

El cemento CFC parece ser una buena alternativa al cemento de PMMA. De hecho, las propiedades carcinogénicas no tóxico y de los cementos de fosfato de calcio (CFC) hacen que sean más convenientes que el cemento óseo PMMA. Otras propiedades interesantes como el fraguado no exotérmico, la contracción insignificante y sobre todo una excelente reabsorción in vivo son activos importantes [18].

El primero que propuso un cemento de fosfato de calcio biomédico son Legeros et al. [1982], mientras que Brown y Chow [1985] depositó una patente hace desde un poco más de veinte años. Desde entonces, muchas formulaciones se han desarrollado, diseñado y comercializado [Hanker et al 1986; Monma et al 1988; Mirtchi et al 1989; Lacout et al 2000]. Sin embargo, estos cementos tienen cada uno sus limitaciones y a veces se reserva para usos exclusivos, tales como la cirugía dental. La investigación sobre el tema, por lo tanto se intensificó en los últimos años, como lo demuestra el crecimiento exponencial del número de artículos que tratan de cementos de fosfato de calcio, especialmente en las bases de datos biomédicas científicas. Este interés de los cementos hidráulicos se debe principalmente a su biocompatibilidad, su bioactividad, su capacidad para adaptarse a la forma del defecto óseo por cubrir y, más recientemente, a su facilidad de implementación y aplicación.

#### 4.1.8. **Propiedades requeridas para un cemento óseo inyectable**

Para mejorar las propiedades de los CPC, en particular, su inyectabilidad, que es su mayor problema, algunos estudios han tenido y tienen que ser realizados como por ejemplo sobre las propiedades de inyectabilidad del cemento, la geometría y el comportamiento mecánico del hueso trabecular y la del cemento. Vamos a enumerar las propiedades requeridas para que un cemento sea inyectable.

1. **Moldeabilidad e inyectabilidad.** Los cementos de CaP pueden inyectarse y llenar una cavidad in situ. La masa inyectada se adapta al espacio a llenar (estado pastoso) y el fraguado se produce in situ después de un tiempo.
2. **Perfecta adaptación a la cavidad llenada.** El cemento inyectado se adapta perfectamente a la cavidad rellena de forma que existe un contacto íntimo entre el cemento y el hueso. El gap existente es inferior a las 10 micras por lo que se facilita el crecimiento óseo.



3. **La reacción de curado no es exotérmica** para impedir la necrosis.
4. **Ausencia de toxicidad.**
5. **Capacidad de fraguar en contacto con los fluidos corporales (sin sufrir descohesión).**
6. **Tiempos de fraguado y endurecimiento razonables.** La resistencia máxima del cemento se alcanza en un tiempo mínimo después de implantación. Este tiempo debe ser cercano a la duración de la anestesia; los pacientes deben ser capaces de moverse rápidamente de nuevo.
7. **Ausencia de contracción de volumen en el fraguado.**
8. **Adquisición de una dureza apropiada para evitar el colapso vertebral.**
9. **Biocompatibilidad:** El cemento no debe provocar respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes
10. **Bioactividad:** El cemento debe provocar una respuesta de su medio para que se creen enlaces entre ellos.
11. **Osteoconduccion:** El cemento debe ser capaz de promover la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento.
12. Tasa de resorción adecuada
13. Viscosidad inicial prácticamente invariable con el tiempo de fraguado y con la viscosidad inicial baja sin que tenga potencial de **extravasación.**
14. **Microporosidad** (poros<10µm) para facilitar la circulación de los fluidos biológicos.
15. **Macroporosidad** (poros>100µm), para ofrecer el andamio para colonización celular. En efecto, el control de la porosidad debe favorecer tanto la resorción de cemento y el nuevo crecimiento de tejido óseo.

16. **Trabajabilidad** ~5-10 min: el período durante el cual es posible moldear el cemento sin dañar su microestructura es lo suficientemente largo como para facilitar la colocación de cemento in-situ.
17. **Fácil preparación/ manipulación**: la mezcla de cemento es fácil y reproducible y que da lugar a una pasta homogénea sin grumos
18. **Cohesión óptima** (i.e sin desintegración durante el fraguado; necesidad de viscosidad elevada de l pasta)
19. **Coste bajo**

#### 4.1.9. Características de los cementos de fosfato

Los cementos de fosfato de calcio (CFC) se obtienen a partir de la mezcla de una solución acuosa con uno o más fosfatos de calcio, que al disolverse dan lugar a la precipitación de un fosfato de calcio menos soluble. Independientemente de la composición inicial de los CFC, se forman sólo dos productos finales: apatita y brushita. Las propiedades de fraguado y de endurecimiento de un cemento apatítico de fosfato tricálcico, son controladas por procesos de disolución y precipitación, conforme con la ecuación (eq.1)

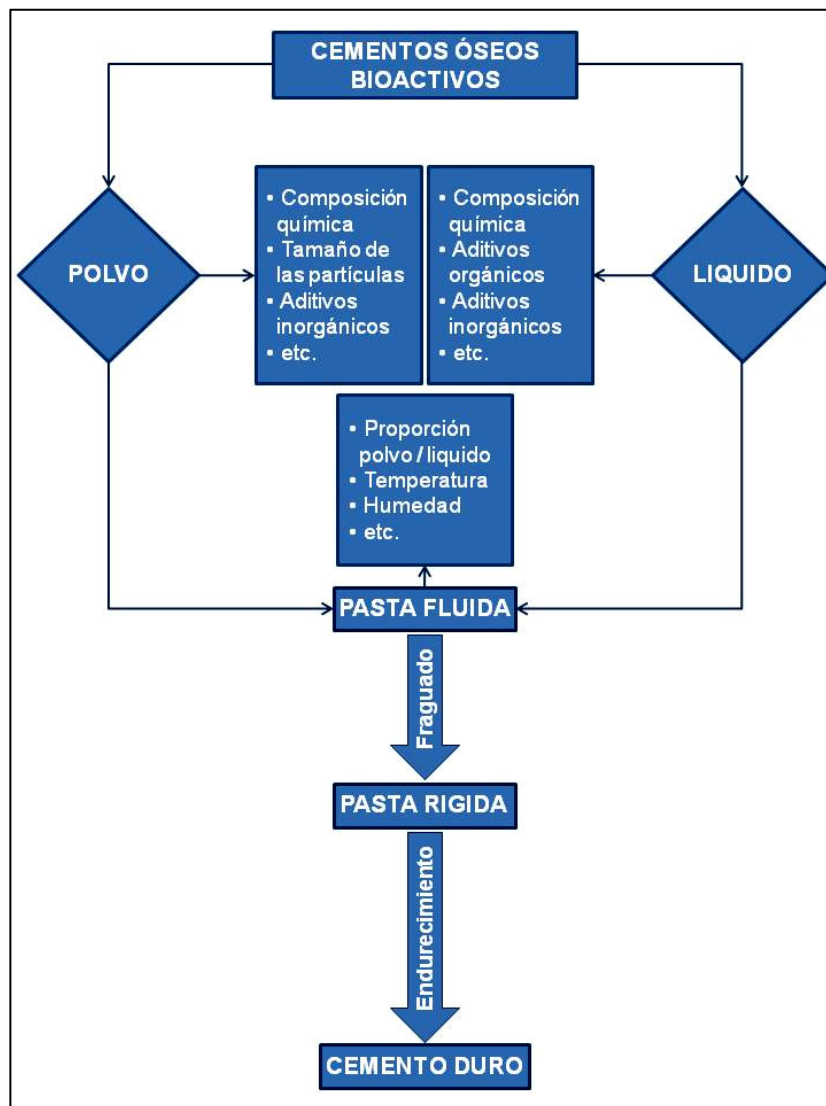


La Figura 12 muestra las etapas y los factores que influyen en la calidad de un cemento óseo obtenido por mezcla de polvo y agua.

El fosfato de calcio se emplea en bioingeniería por su ratio calcio/fosfato respecto a la fase de hidroxiapatita (HA). Tiene la mayoría de las características requeridas para un cemento inyectable es decir:

- solubilidad
- alta biocompatibilidad
- perfecta aposición material tejido-óseo
- osteoconductividad





**Figura 12.** Esquema de la elaboración de un cemento óseo.

La solubilidad de los fosfatos tricálcicos permite utilizarlos como cemento (combinación de polvo y solución acuosa) que tiene la ventaja de ser inyectables y de no presentar no contracción en volumen ni exotérmica durante su fraguado; La arquitectura porosa necesaria a la utilización de tales materiales como andamios e obtiene medio agente espumante [19] durante el proceso de fraguado lo que procede a una estructura porosa de HA deficiente en calcio [20] muy parecida a la del hueso.

En contra parte, los cementos de TCP poseen una lenta velocidad de reabsorción en vivo. Esta desventaja puede ser aminorada utilizando cementos con macroporos que favorecen todavía más formación de hueso y por lo tanto la reabsorción del biomaterial.

Los fosfatos de calcio presentan algunas ventajas en comparación con los cementos acrílicos, como una alta biocompatibilidad, es decir que tienen una composición similar a la de la fase mineral del tejido óseo y tienen una buena bioactividad o sea una buena osteointegración: colonización ósea y degradación. Además son fáciles de manipular y tienen buenas propiedades mecánicas, parecidas a las del hueso.

Sin embargo la inyectabilidad de estos cementos no es reproducible. Su comportamiento en el momento de inyectarlos necesita más estudios. Los principales problemas encontrados con estos cementos son las dificultades de rellenar el tejido óseo por culpa de una mala inyección y de la descohesión del cemento, que se separa en dos fases: una líquida que se inyecta y otra sólida que forma un conglomerado en la jeringa y actúa como filtro. Según diferentes estudios se puede mejorar la inyectabilidad de los CFC actuando sobre diferentes factores como el tamaño de las partículas, la temperatura, la relación Líquido/Polvo o la adición de aditivos, como el ácido cítrico.

La mayor parte de los estudios sobre VP o CP se hace mediante los cementos acrílicos porque hoy en día es el único cemento que tiene buena reproducibilidad e inyectabilidad. Sin embargo, parece imprescindible entender y poder predecir el comportamiento de los CFC durante la inyección para las técnicas de mínima invasión.

#### 4.1.10. Propiedades mecánicas de los cementos óseos

En la tabla adjunta se presentan las principales propiedades mecánicas (resistencia a la compresión, resistencia a la tracción y módulo de Young) de cerámicas densas y porosas comparadas con el hueso esponjoso y cortical. Los resultados han sido obtenidos por varios autores (LeGeros, R. Z.: Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science, Vol. 15, Ed. H. M. Myers, Karger, Basel, 1991.). [21]



<b>Material</b>	<b>Resistencia a compresión MPa</b>	<b>Resistencia a tracción MPa</b>	<b>Módulo de Young MPa</b>
<b>Hueso esponjoso</b>	2-12	10-20	
<b>Hueso cortical</b>	100-230	50-150	
<b>Cerámicas porosas</b>	30-170	41,8	
<b>Cerámicas densas</b>	917	78-196	3,45-10,34
	120		
	308-509	38-48	
	390	115	

---

**Tabla 1.** Propiedades mecánicas de cerámicas de fosfato de calcio y de hueso. [21]

El principal objetivo de este estudio es caracterizar la microestructura de espumas de poliuretano y compararla con la de tejido óseo trabecular. Se utilizarán técnicas de obtención de imágenes como el SEM, la tomografía o la microtomografía. En este proyecto se ha utilizado un software libre de tratamiento de imágenes ImageJ y su plugin BoneJ. Los datos obtenidos serán comparados con los de hueso trabecular en la literatura científica. Además, con las imágenes, se debería efectuar reconstituciones tridimensionales con el software 3D Doctor. Los datos obtenidos serán ficheros STL. Un fichero STL sólo describe la geometría de la superficie de un objeto en 3D y es el tipo de fichero que utiliza el software de modelización y simulación como COMSOL, Abaqus, SolidWork, entre otros. Unos software de visualización en tridimensional como CTvol se ha ido utilizado.

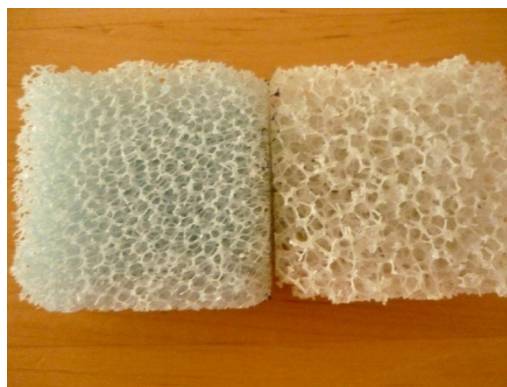
La meta será de obtener un modelo tridimensional de nuestras espumas que estarán adecuadas hacer prototipos rápidos. En cuanto obtengamos todas las informaciones, modelos rápidos se podrán obtener para hacer inyecciones y comparar con la simulación siempre con la misma base. A partir de esto, el estudio del comportamiento del fluido con distintas propiedades de viscosidad en mismas geometrías.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Presentación de las muestras

Durante este proyecto, hemos trabajado con espumas de poliuretano cuyas fotos se puede ver más abajo. Los modelos estándar del hueso están fabricados con un material sólido de espuma rígida de poliuretano esponjoso. La espuma rígida de poliuretano sólido tiene propiedades más uniformes que el hueso esponjoso natural. La espuma rígida de porosidad abierta, no tiene como altos valores de resistencia a la compresión como la espuma rígida de poliuretano celular, pero es conveniente para una variedad de aplicaciones que requieren la estructura de celdas abiertas, como la inyección de cemento y modelización esponjoso hueso osteoporótico.

Los huesos están compuestos diseñados para simular el comportamiento físico de un hueso humano, proporcionando una alternativa para los huesos de cadáver en las pruebas y la investigación. El comportamiento mecánico de los materiales óseos compuestos cae dentro del rango de las muestras de cadáver. Huesos compuestos han mostrado variabilidad significativamente más bajos en las pruebas en comparación con las muestras de cadáveres de todos los regímenes de carga, ofreciendo un banco de pruebas más fiables. Otras ventajas de las pruebas con los huesos compuestos incluyen tamaños ilimitados de la muestra con un manejo especial o de los requisitos de conservación.



**Figura 13.** Fotografía de los modelos de hueso de poliuretano.



Estas espumas comerciales tienen una porosidad abierta parecida a la del hueso trabecular. La estructura de la célula es más del 95% de apertura. El tamaño de la celda es de 1,5 a 2,5 mm. Nuestras muestras tienen respectivamente una densidad de  $0,09\text{g/cm}^3$  y  $0,12\text{g/cm}^3$  menos que un típico hueso trabecular humano ( $1.9\text{g/cm}^3$ ) [22]

Una de las dos tiene poros gruesos (espuma azul a la derecha) y la otra, pequeños (espuma blanca a la izquierda). La primera etapa será obtener imágenes de su estructura a varias escalas y tratar las imágenes obtenidas para tener parámetros esenciales a la caracterización de sólidos porosos. Los datos comerciales son los siguientes:

Compresión		Densidad	
Resistencia	Modulo		
(MPa)	(MPa)	(Pcf*)	(g/cm <sup>3</sup> )
0,11	6,2	5,5	0,09
0,28	18,6	7,5	0,12

---

**Tabla 2.** Propiedades mecánicas y densidad de las espumas de poliuretano. [23]

\* Pound-force per Cubic Foot

Hay que notar que la resistencia a la compresión es más bajo que la de un hueso esponjoso (2-12MPa) [21]. Ahora que tenemos unos informaciones básicas sobre las muestras. Se va a describir precisamente las técnicas utilizadas para caracterizar a una escala microestructural esas espumas por fin de compararlas a los datos publicados para un hueso real. En efecto, la distribución de materia en el espacio, es decir, su estructura y su arquitectura debe ser evaluada. En este capítulo, se identificarán las diferentes técnicas (SEM,  $\mu\text{CT}$ , CT y tratamientos de imágenes) y se clasificarán los parámetros que puedan calificar y cuantificar la estructura (2D) y la arquitectura (3D) de hueso esponjoso.



## 5.2. Análisis estructural de los modelos de hueso

Se puede analizar la estructura de muestras a varias escalas. Eso depende de lo que se quiere poner en relieve. Se disponen hoy de máquinas suficiente eficientes para caracterizar una estructura de manera macro, micro o ultraestructural.

El estudio a un nivel microestructural de un hueso viene a definir las características en su conjunto es decir: la forma, el tamaño, la geometría y la proporción de subtipos tisulares cortical y trabecular. La técnica más relevante para este tipo de análisis es el análisis radiogrametrico y biomecánica de imagen digital. En efecto, las técnicas de radiogrametricas digitalizada sobre imágenes radiográficas (DRX), de tomografía computarizada cuantitativa volumétrica o densitométricas permiten estudiar diferentes variables morfológicas y biomecánicas implicadas en la resistencia ósea.

El presente proyecto se inscribe en la caracterización microestructural. A ese nivel de estudio, se describe como la distribución espacial de los materiales que componen el tejido óseo o aquí una espuma de polimetacrilato. Las tres técnicas que son útiles para esta etapa son:

- Las técnicas de análisis microtextural y de esqueletonizacion que se usan sobre las imágenes radiográficas, de TAC y densitométricas.
- La micrografía computarizada (micro-CT) que es una técnica no destructiva muy precisa (resoluciones hasta 5µm). Esta técnica va a ser muy importante en la caracterización de las muestras como soporte para obtener modelos tridimensionales y el análisis de los parámetros histomorfológicos.
- La histomorfometria que permite obtener un análisis cuantitativo de unos parámetros morfologicos indispensable a la comprensivo de la arquitectura del tejido óseo. Esta etapa, se hará con el software libre ImageJ.

Por fin, el análisis ultraestructural óseo describe el tejido a un nivel molecular. Así que las técnicas utilizadas para este paso son muy precisas y con una alta resolución. Por ejemplo, la microscopia electrónica de Barrido (SEM) alcanza a una resolución entre 3 y 20 nm. La microscopia de fuerza atómica (AFM) es una técnica mecano-óptica capaz de detectar fuerzas del orden de los pico newton. [24]



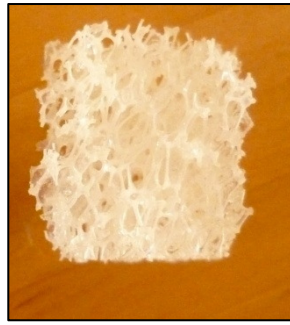
## 5.2.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

### 5.2.1.1. Principio del SEM

El microscopio electrónico de barrido -SEM- es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra. Las imágenes obtenidas son de alta resolución (entre 3 y 20 nm). Eso permite la visualización morfológica superficial del hueso. El SEM presenta una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. La preparación de las muestras es relativamente fácil pues la mayoría de SEMs solo requieren que estas sean conductoras, propiedad que se consigue recubriendo las muestras con una capa delgada de metal [25]. Nuestras muestras fueron estudiadas en el Servicio de Microscopía Electrónica, CMEM, UPC.

### 5.2.1.2. Preparación de las muestras

La preparación de muestras es, en general, sencilla. Los requisitos indispensables que deben cumplir son ausencia de líquidos, es decir, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se la recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro gracias a una deposición por sputtering. Este recubrimiento ha de ser suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés. Así que hacemos una deposición de oro. [25]



**Figura 15.** Fotografía de una muestra no-conductora

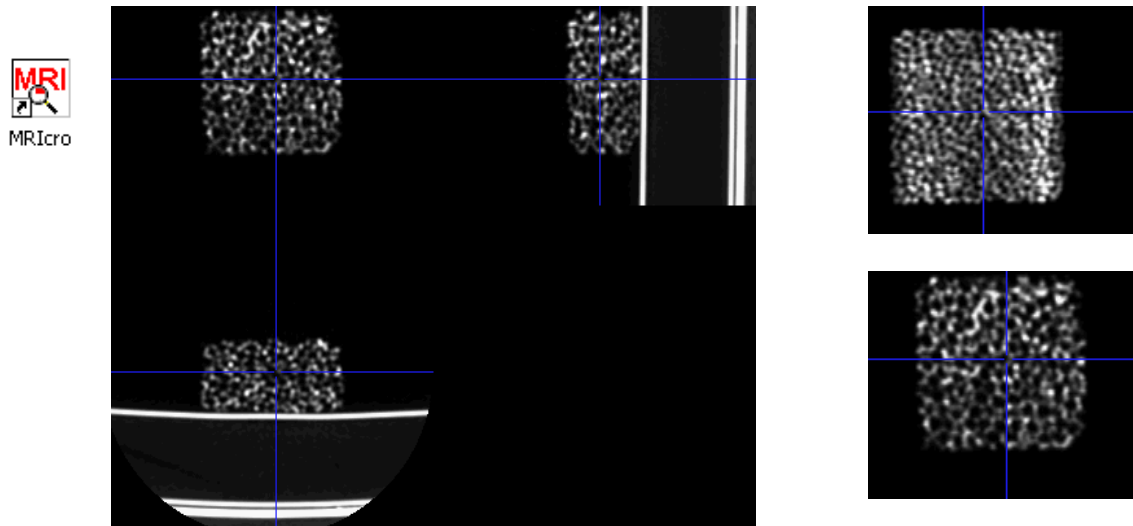


**Figura 14.** Fotografía de una muestra conductora con depósito de oro

## 5.2.2. Tomografía CAT (tomografía asistida por ordenador)

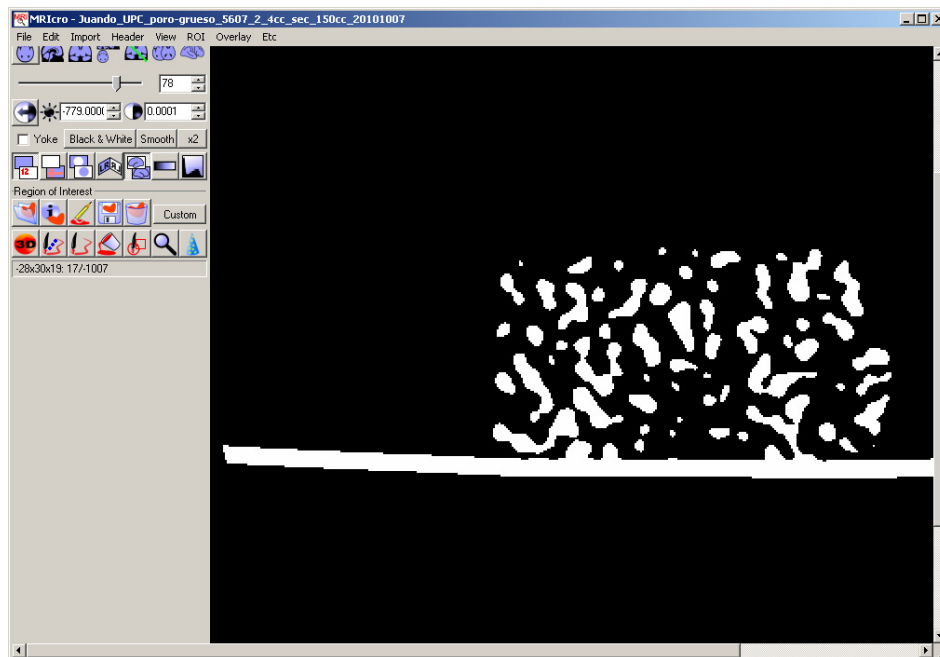
### 5.2.2.1. Principio de la tomografía

Los scans CAT de las muestras habían hecha en el Instituto de Alta Tecnología del Parque de Recerca Biomédica de Barcelona.



**Figura 16.** Imagen TAC con el software de conversión de imagen *MRicro*.

Tomografía asistida por ordenador, conocido comúnmente como una tomografía computarizada toma imágenes de la sección transversal del cuerpo. Se utilizan para detectar fracturas, lesiones e infecciones en la columna vertebral. Una tomografía computarizada obras de encajonar el cuerpo con una radiografía. Un equipo que se utiliza para formatear la imagen en secciones de la columna que se repiten en varios intervalos distintos.



**Figura 17.** Imagen TAC con el software de conversión de imagen *MRIcro*.

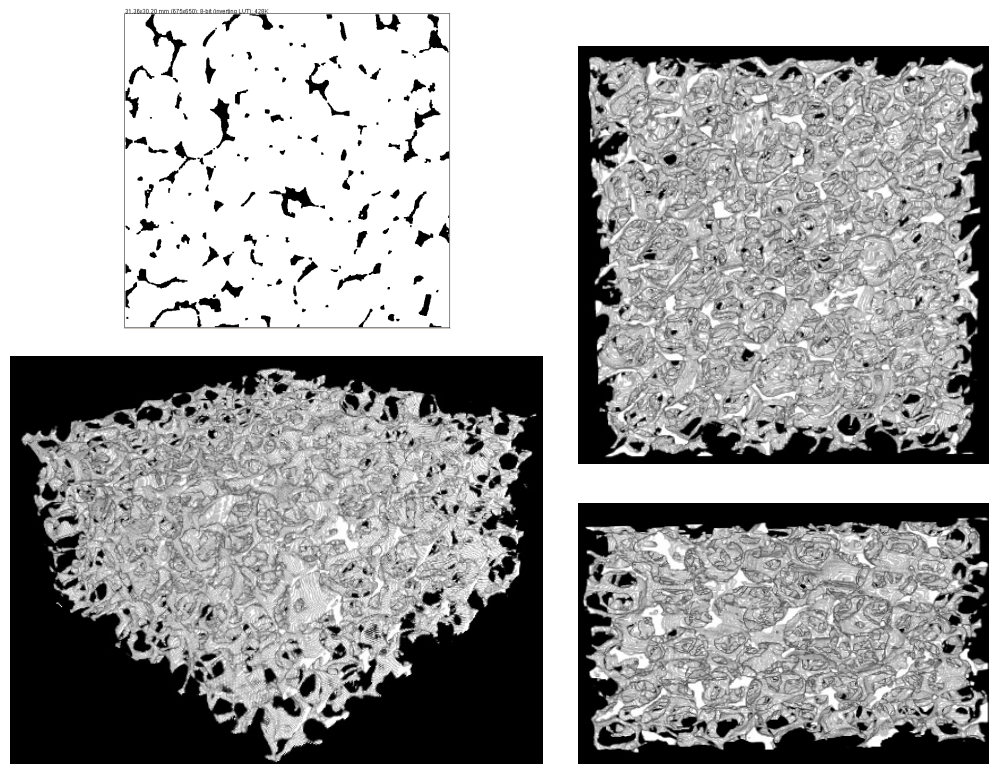
La longitud de paso de escaneo, es decir, distancia física sucesiva entre imágenes en nuestro caso es igual al grosor de corte 0.63 mm. . El escalado geométrico da el tamaño de píxel. En cuanto a las intensidades, una vez escaladas correctamente (cosa que ya hace automáticamente el programa MRIcro). Las unidades de intensidad del TAC se denominan unidades Hounsfield y están relacionadas con la densidad del objeto. La valor -1000 esta atribuida al aire, 0 al agua y 1000 al hueso compacto. [24]

Nuestras imágenes son de 512 x 512 x 93 (poro grueso) y de 512 x 512 x 129 (poro fino), con un tamaño de 0.19 x 0.19 x 0.63 mm (el máximo de resolución de nuestro escáner) y los datos están guardados como enteros de 16 bits (little endian).

### 5.2.3. Micro tomografía (microCT)

La microtomografía permite obtener una imagen en 3D y varios datos importantes en la caracterización de un elemento poroso como un hueso o una espuma. La micro tomografía computarizada (microCT) es un nuevo método para representar y cuantificar el hueso con muy alta resolución. Se puede estudiar a través de microCT, datos morfométricos 3-D.

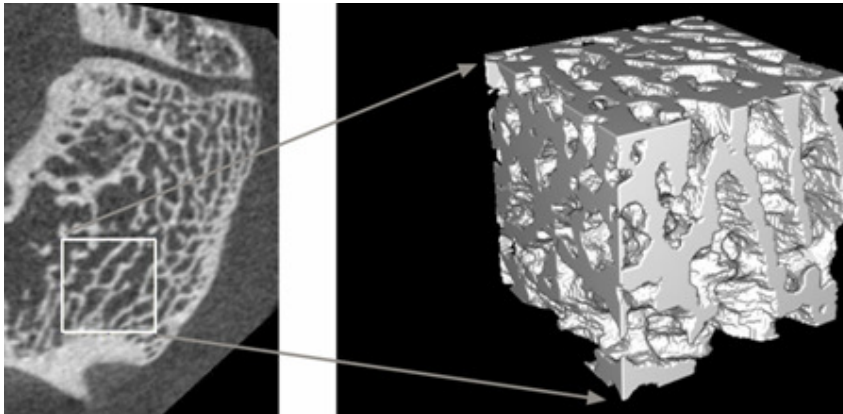
Se dedica al estudio de la morfología de espuma de poliuretano con micro tomografía. Las espumas se fueron cortadas en cubos y varios parámetros de geometría (parámetros histomorfológicos) 2D y 3D fueron estudiado.



**Figura 18.** Obtención de un modelo tridimensional de la espuma azul (poro fino) con la opción *3D Viewer* de *ImageJ*.

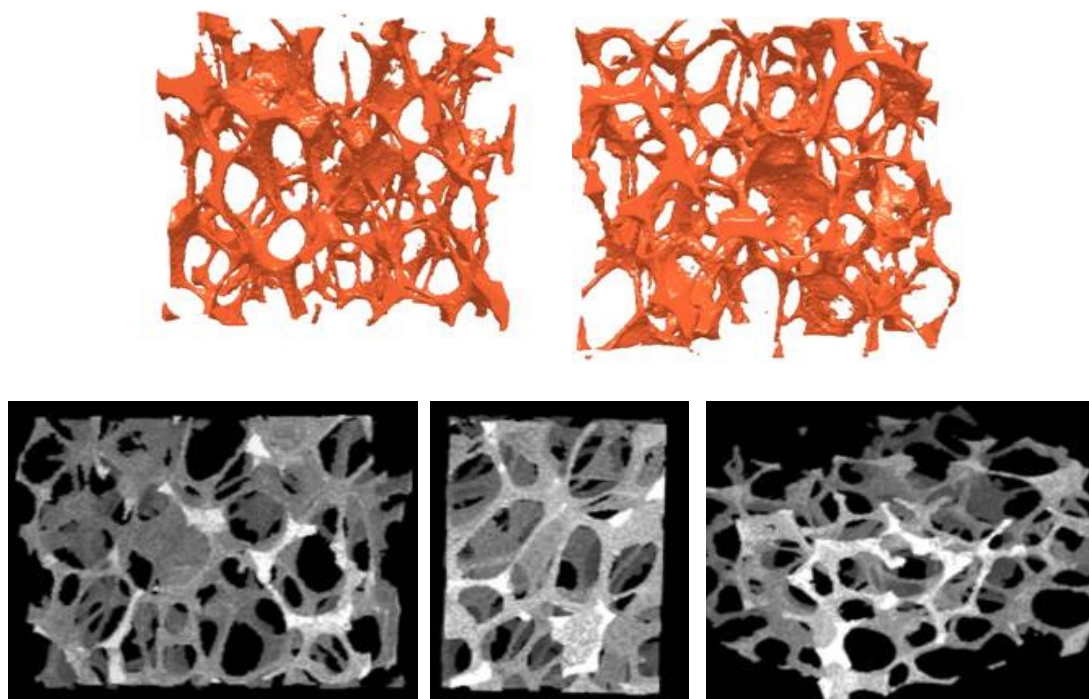


Los ensayos de microCT se realizaron en la UAB departamento sanidad y anatomía animales (GE Healthcare, modelo Micro CT explore Locus). El escaneado se hizo a 80 kVp y 0.5 mA. La distancia física sucesiva entre imágenes es igual al grosor de corte 0.63 mm. En la siguiente figura se muestra la obtención de un modelo sólido tridimensional a partir de la definición de una región de interés (VOI) de un tejido óseo real.



---

**Figura 19.** Reconstrucción de tejido óseo mediante 3DDoctor. Microtomografía obtenidas a partir de la base de datos del software



---

**Figura 20.** Reconstrucciones tridimensionales de los modelos de espuma

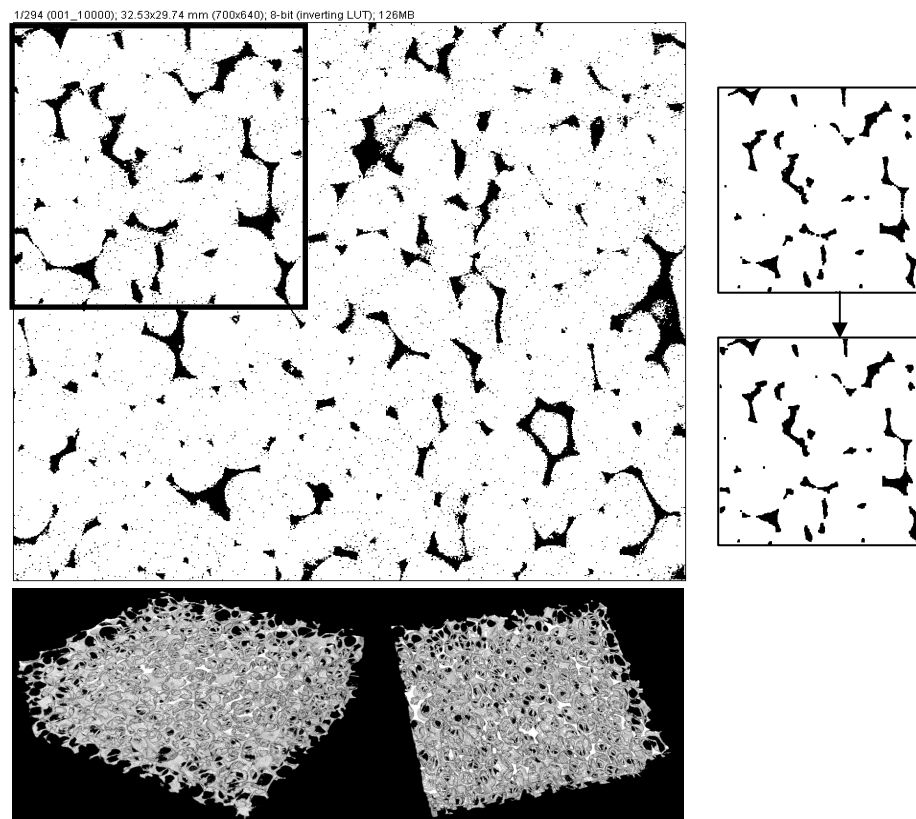


### 5.3. Modelos tridimensionales

#### 5.3.1. Obtención de modelos tridimensionales con varios software

Esta etapa fue obtener una reconstitución tridimensional legible con COMSOL (formato STL) para permitir una simulación o la fabricación de un modelo rápido.

Para obtener imágenes en tres dimensiones se usó el Software 3D doctor que es un software utilizado en el medio médico. Es una herramienta bastante potente, sencilla de utilización que permite modelizaciones en 3D, tratamiento de imágenes y es un software de medición para la resonancia magnética, TAC, PET, microscopía, científicos, industriales y aplicaciones de imágenes.

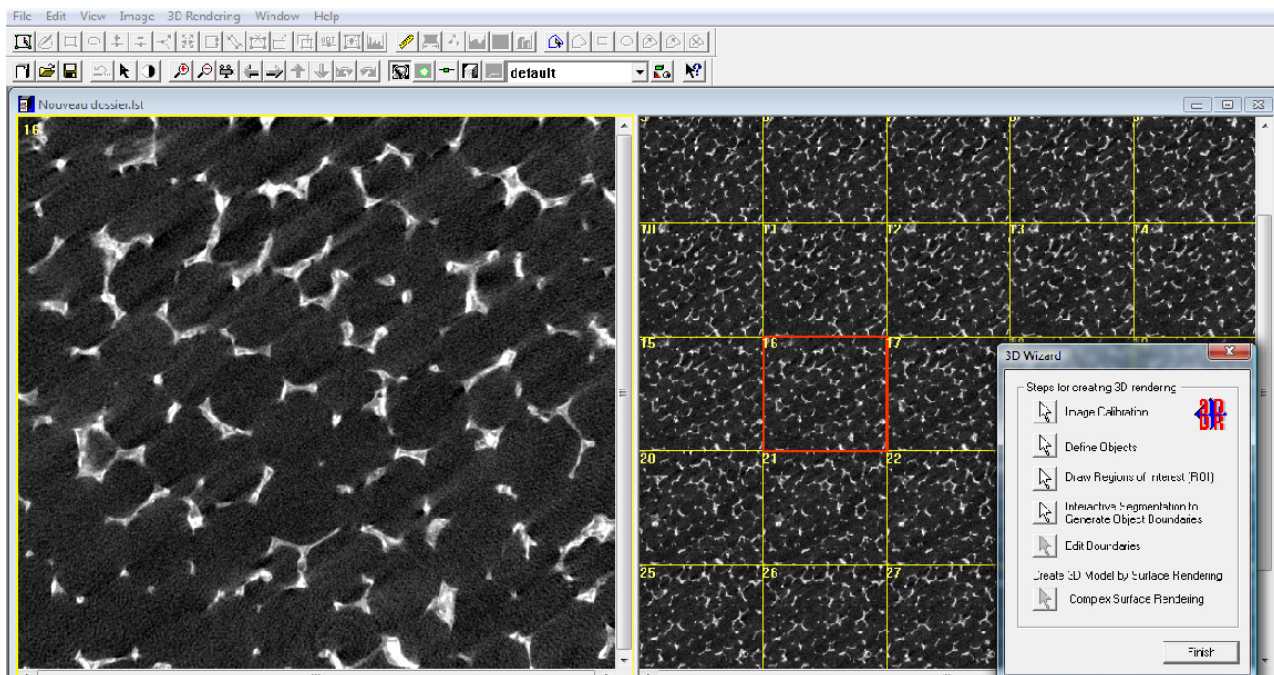


**Figura 21.** Obtención de un modelo tridimensional de la espuma blanca (poro grueso) con la opción *3D Viewer* de *ImageJ*



A continuación se describe paso a paso como crear un modelo tridimensional a partir de las imágenes de Micro-CT y/o TAC con la ayuda de *3D-Doctor*.

### Paso 1: Selección de las imágenes



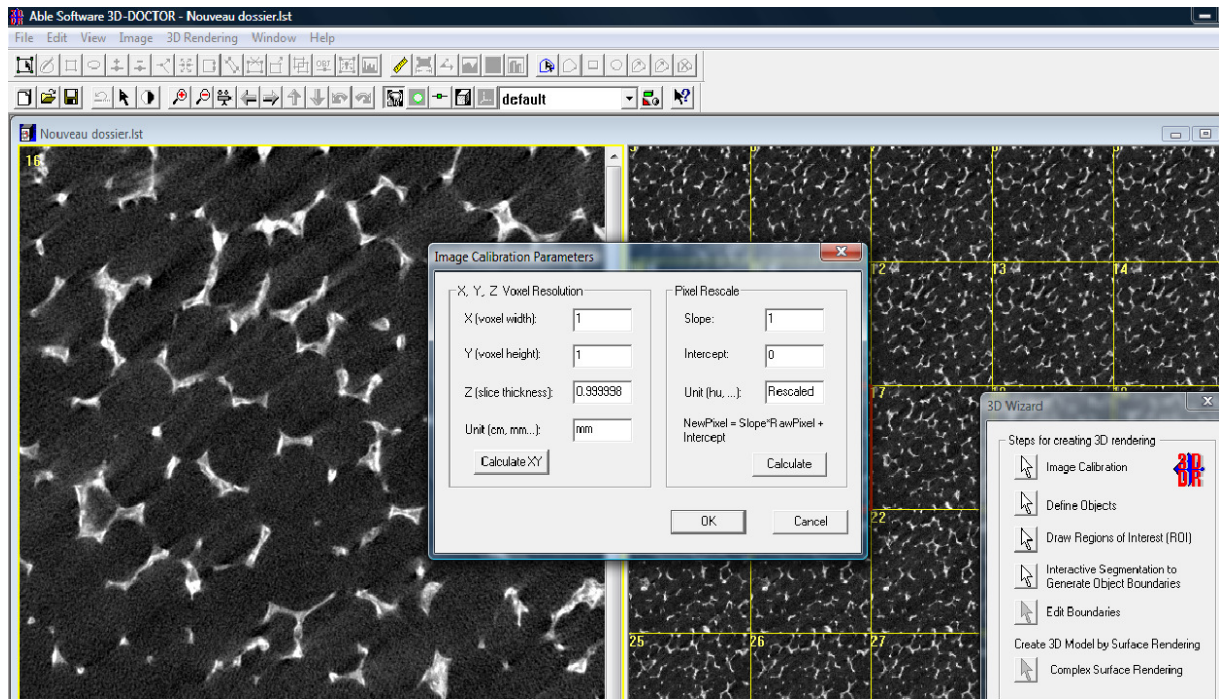
**Figura 22** Tutorial *3D Doctor* selección de imágenes

Las imágenes son seleccionadas desde la carpeta en la que están contenidas. En el caso de estudio se han seleccionada más de 500 imágenes para cada una de las muestras. Las imágenes tienen una resolución de 46 micras.



## Paso 2 Calibración de las imágenes

En este segundo paso se define resolución o tamaño de cada una de las imágenes

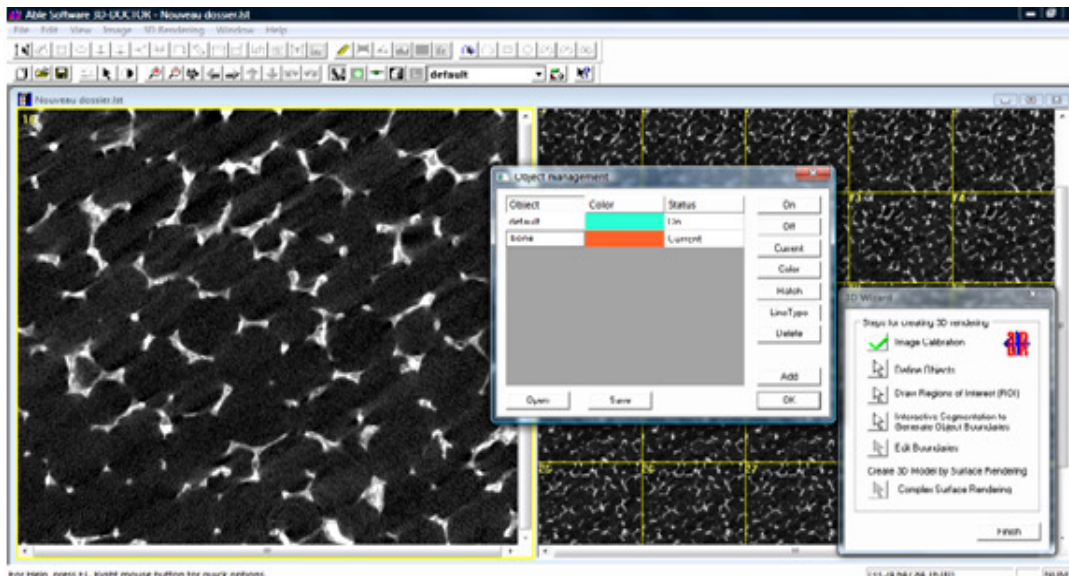


**Figura 23.** Tutorial *3D Doctor* calibración de las imágenes

## Paso 3 Determinación de los varios elementos

Esta etapa consiste en añadir los diferentes elementos que 3D Doctor deberá identificar. En este proyecto toda la parte solida se considera como un elemento: el hueso.

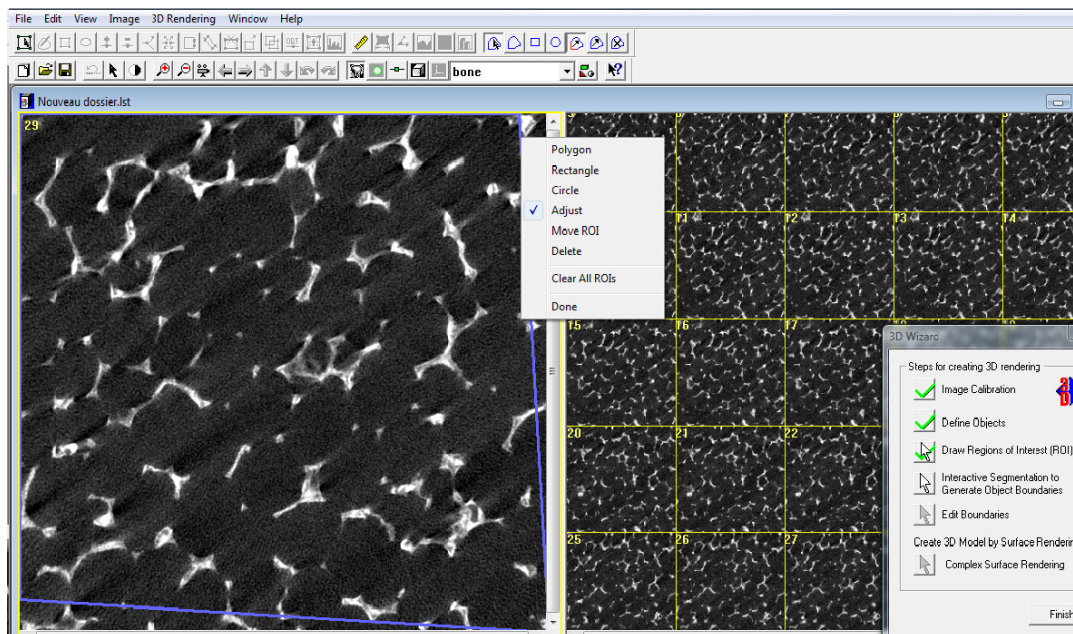




**Figura 24.** Tutorial 3D Doctor determinación de elementos

#### Paso 4 Definir una región de interés

Definición del **ROI** o región de interés. Selecciona un área de la imagen para reconstruir el modelo 3D. La selección reduce los cálculos y permite obtener una imagen 3D rápidamente.



**Figura 25.** Tutorial 3D Doctor determinación de la ROI



### Paso 4 Ajustar el umbral

A partir de la gama de grises representado en la figura se define el contorno que define la espuma respecto del medio exterior.

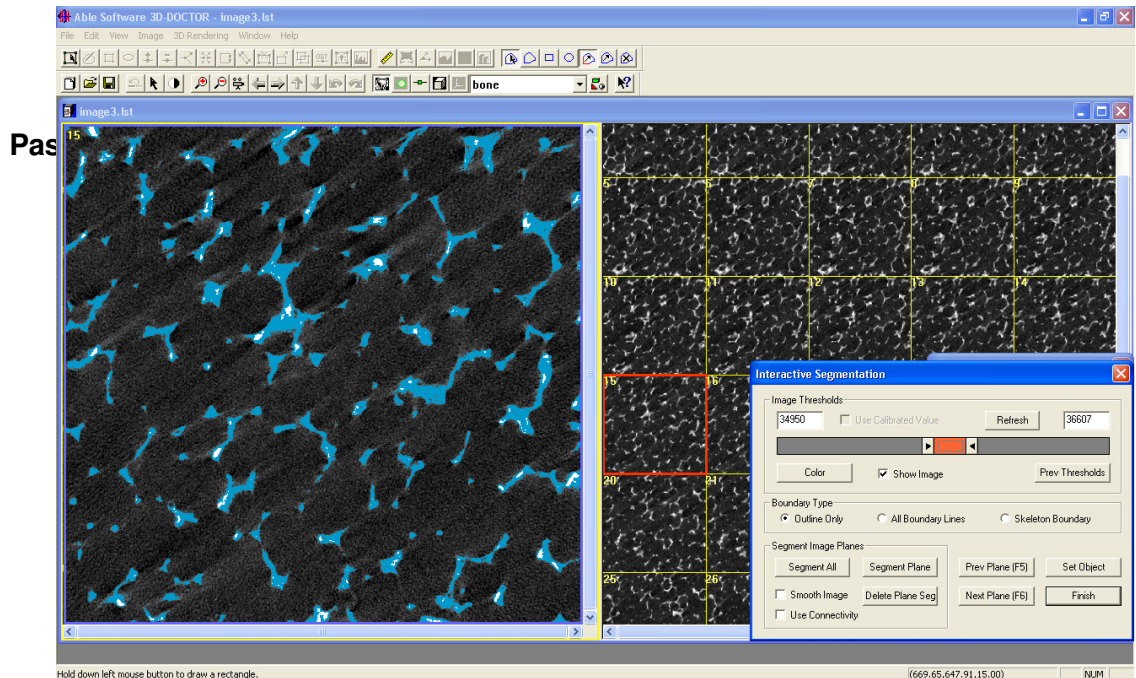


Figura 26. Tutorial 3D Doctor determinación del umbral

### Paso 5 Creación de un modelo tridimensional

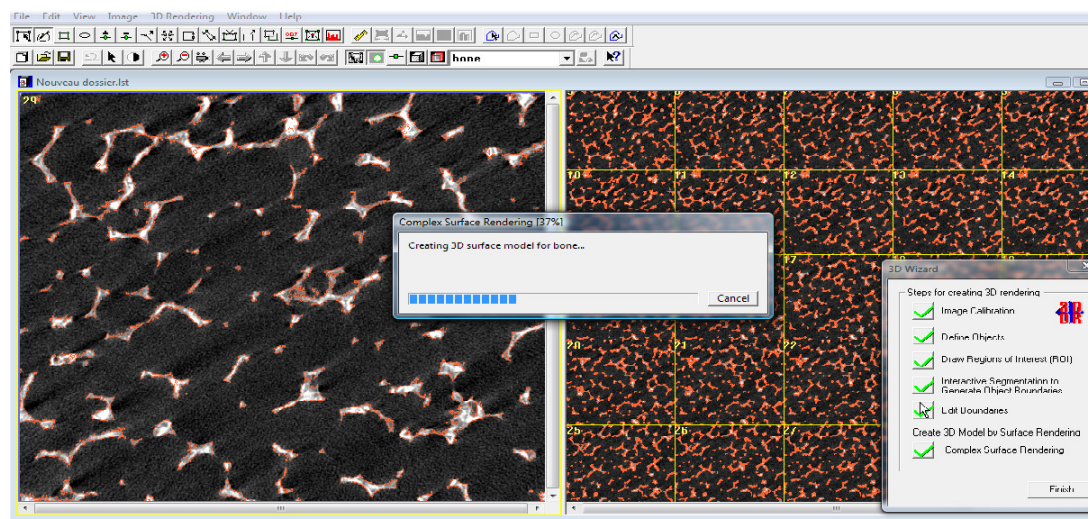


Figura 27. Tutorial 3D Doctor creacion de un modelo 3D



## Paso 6 Guardar la imagen como fichero STL

Los modelos guardados puede abrirse en aplicaciones CAD como CATIA V5, SolidWorks o AutoCAD o herramientas CAE como COMSOL o ANSYS. Hay que ir a “file” después “export” y elegir el formato STL

### 5.3.2. Utilizaciones posibles de un modelo tridimensional

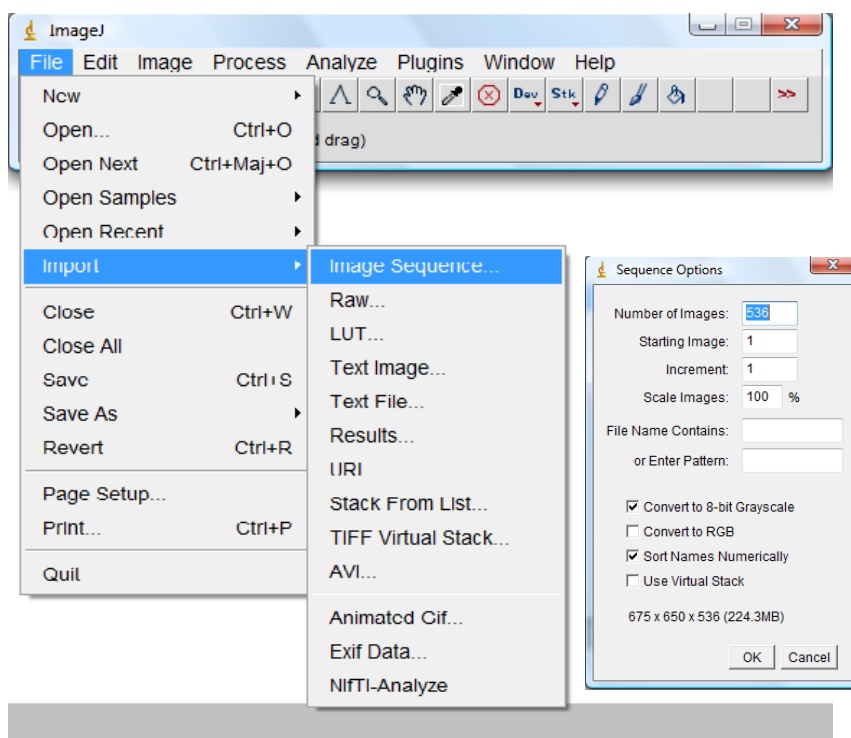
- a) **Simulaciones por ordenador del comportamiento mecánico y simulaciones numéricas sobre procesos de inyección de cementos óseos.**
- b) **Construcción prototipos rápidos a escala.**

Construcción prototipos rápidos a escala nos permitiría crear un modelo físico real a partir de una microtomografía de una vértebra real de un paciente y probar distintas formulaciones de cementos o parámetros de inyección. Es importante describir las técnicas que son capaces de dar la resolución adecuada para reproducir la microestructura de la espuma.

## 5.4. Tratamiento de imagen

### 5.4.1. Determinación de la porosidad

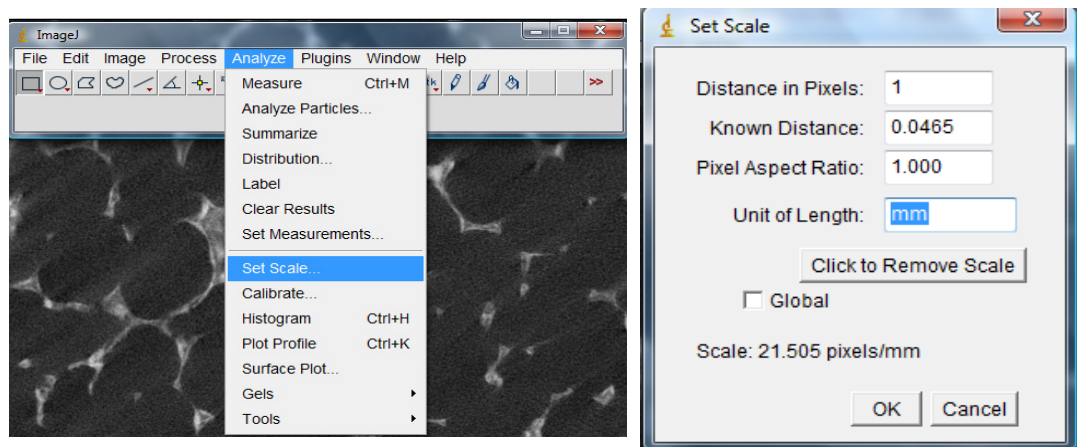
#### Paso 1 Importación de imágenes



**Figura 28.** Tutorial ImageJ Selección de las imágenes

## Paso 2 Determinación de la escala

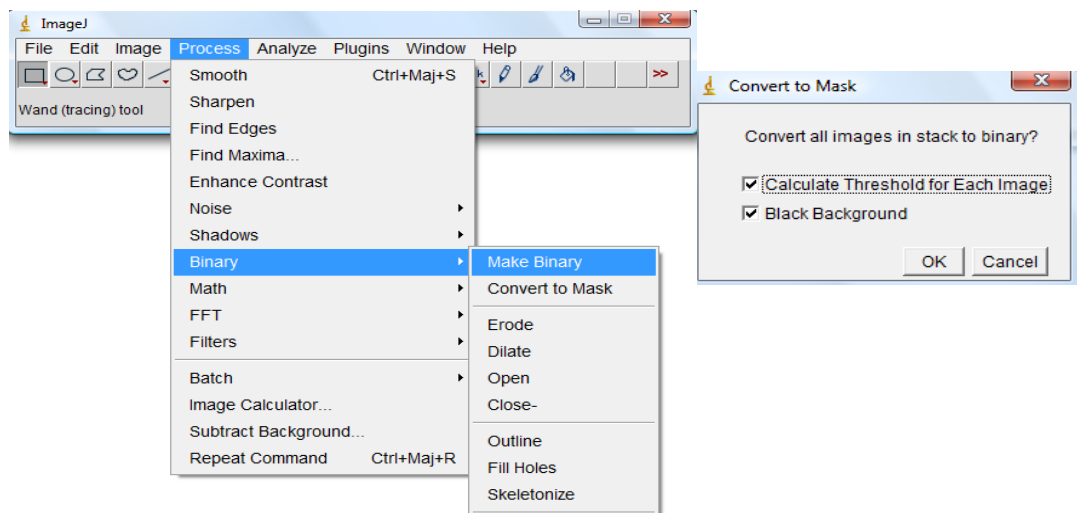
Se sabe que un pixel esta equivalente a 46micron entonces se utiliza el *set scale* para definir la escala



**Figura 29.** Tutorial ImageJ determinación de la escala de una imagen de micro CT

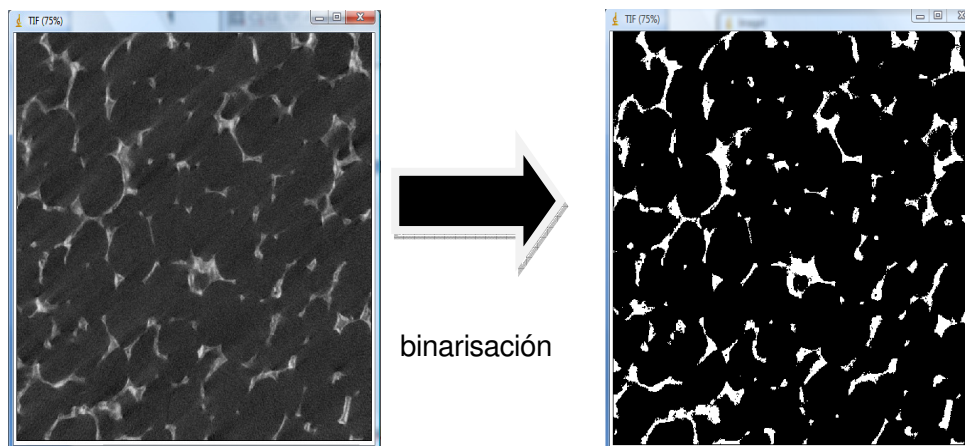
## Paso 3 Binarizacion

El software de tratamiento de imagen ImageJ trabaja sobre una imagen binarisada para distinguir la parte solida del resto. Asi, se utiliza la opción de binarizacion.



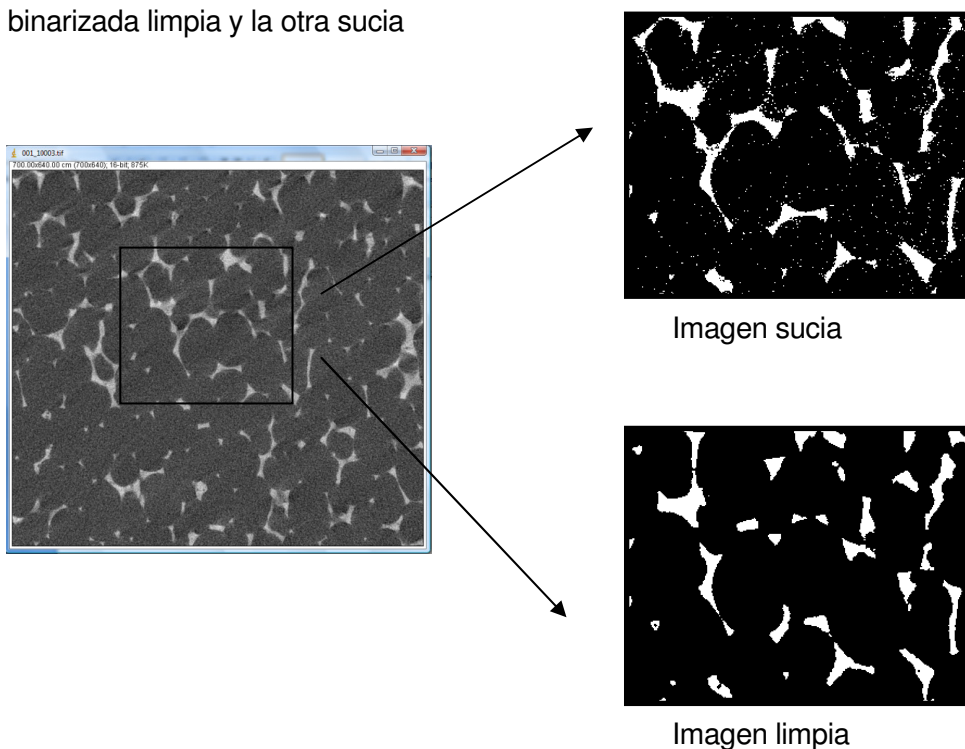
**Figura 30** Tutorial Imagen: Binarizacion de una imagen de microCT





**Figura 31.** Tutorial ImageJ Imagen antes y después la binarización

A veces, hay que limpiar las imágenes con la opción “smooth” (ctrl+MAJ+S) antes de binarizar. Esa fue el caso para las imágenes de la espuma blanca; Mas abajo, para demostrar la importancia de la calidad de la imagen, se muestra la diferencia entre una imagen binarizada limpia y la otra sucia



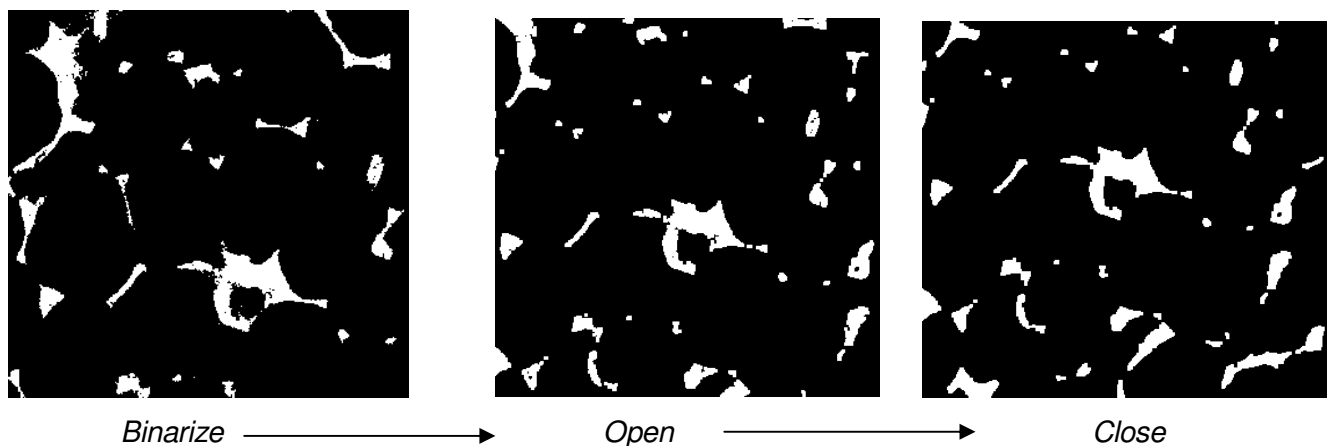
**Figura 32.** Tutorial ImageJ Imagen antes y después la limpieza

Hay que notar que el limpiar la imagen, se pierde unas informaciones. Hay una erosión de la parte solida. En efecto, algunas partes blancas que no son impurezas sino parte solida de la espuma, desaparecen. Esto va a influir los parámetros calculados después.

### Paso 3 Open/Close funciones

Para utilizar la opción “particule analizar” la parte solida de la espuma debe ser asimilable a partículas llenas. Es decir que el software debe visualizar cada parte solida entera sin agujero o irregularidades. Si no se puede obtener porosidad muy inferior a lo que sea realmente porque se considera i=una misma parte solida muchas veces.

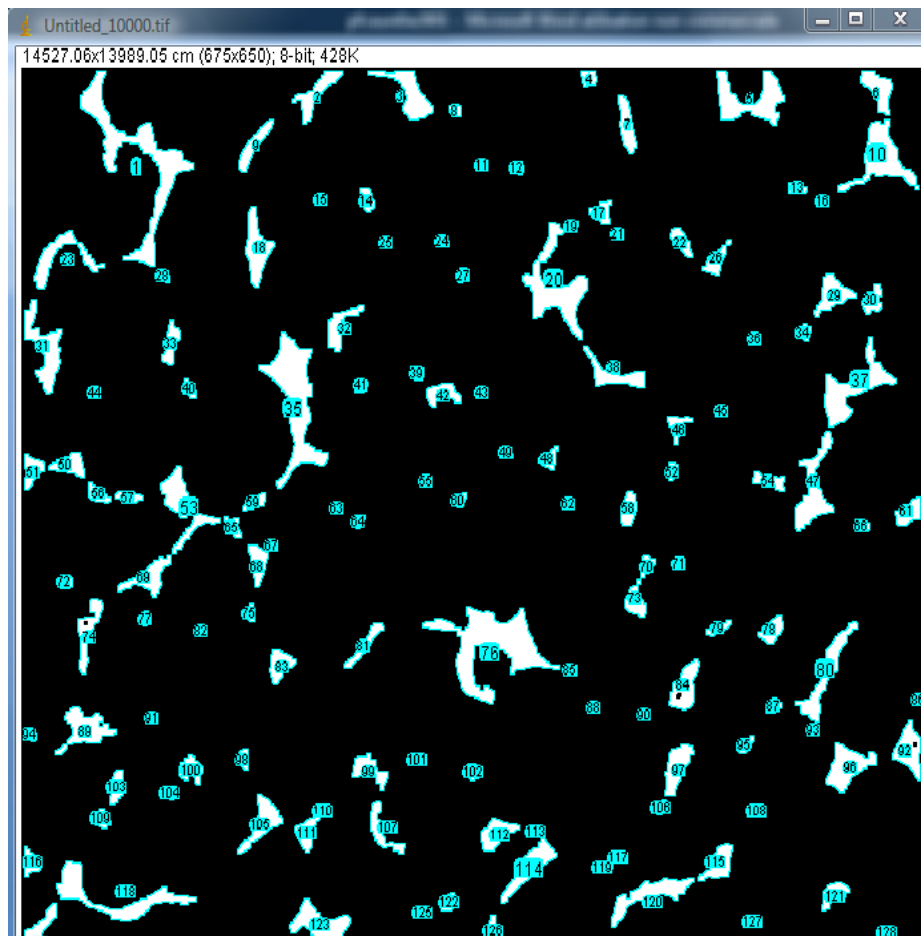
Para evitar eso, se debería utilizar sobre la imagen ya binarizada las funciones Open y Close del software imageJ.



**Figura 33.** Tutorial ImageJ Operaciones preliminares al cálculo de la porosidad

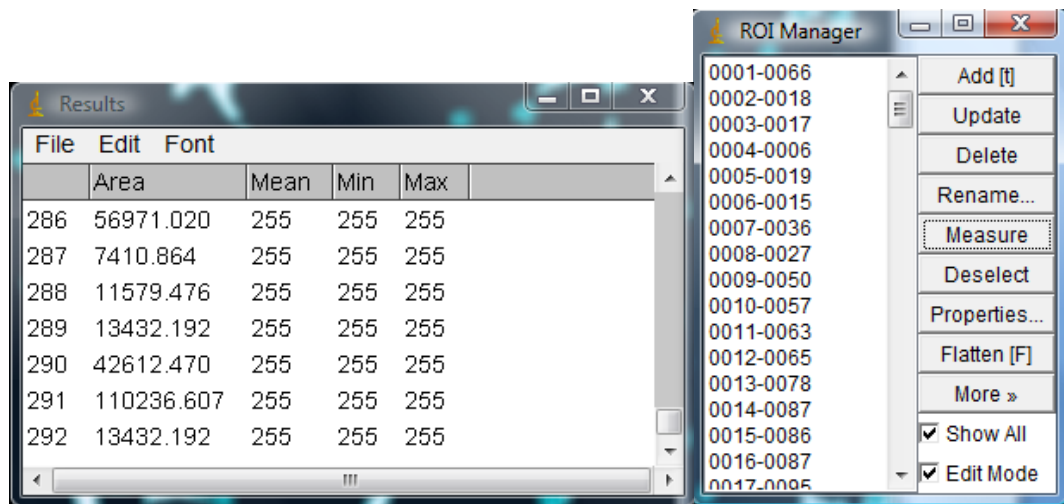




**Paso 4 *Particle Analyzer***

**Figura 34.** Tutorial ImageJ Imagen cuyas partículas están analizadas por "*particle analyzer*"





**Figura 35.** Tutorial ImageJ Resultados "particle analyzer"

Para calcular la porosidad con este método, se suma todas la superficie de las partículas y se divide por el volumen total de la muestra. Para una imagen se utilizara:

<i>Count</i>	<i>Total Área (mm<sup>2</sup>)</i>	<i>Average Size</i>	<i>Área Fraction</i>	<i>Mean</i>	<i>Mode</i>	<i>Perim.</i>	<i>Major</i>	<i>Minor</i>
149	80.820	0.542	8.5	255	255	3.437	1.036	0.486

**Tabla 3.** Medición de la porosidad de una imagen de microCT

$$Porosidad = \frac{80,820mm}{(31,35 \times 30,20)} \times 100 = 8,53\% \quad (\text{Eq.2.1})$$



O toda la espuma: con la ecuación 2.2

$$Porosidad = \frac{26861mm}{(32,53 \times 29,74) \times (240slides) \times 362slides} \times 100 = 7,66\% \quad (Eq.2.2)$$

#### 5.4.2. Caracterización microestructural y arquitectural

La microarquitectura trabecular ósea es ahora reconocida como un componente importante de la calidad del hueso. Otros factores son el nivel de remodelación, el tamaño de los cristales de hidroxapatita, la calidad del colágeno entre otros. El valor biomecánica del hueso como biomaterial depende tanto de su volumen y también en su distribución adaptada en el espacio 3D, es decir, que según la manera de solicitarlo, la respuesta no será la misma (anisotropía de propiedades mecánicas).

##### ➤ <sup>1</sup>T.V

El volumen total del volumen de interés (VOI). La medición de volumen 3D se basa en la acción de contar los voxels. Hay que tener en cuenta que en el caso de hueso ASBMR nomenclatura, el término "tejido" simplemente se refiere al volumen de interés. Esto no significa ningún tipo de reconocimiento de cualquier rango de densidad particular por lo que los tejidos biológicos, suave, duro o de otra manera. [26] Por eso, el T.V en nuestro caso corresponde solo al volumen total de la muestra estudiada.

##### ➤ <sup>2</sup>B.V

El volumen total de objetos binarios dentro del VOI. La medición de volumen 3D se basa en el modelo de volumen marcha cubos de los objetos binarios dentro del VOI. [26] En el caso de la espuma evaluada el valor B.V se refiere al volumen total de hueso

➤ <sup>3</sup>B.V/TV

La proporción de la VOI binarizado ocupado por los objetos sólidos. Este parámetro sólo es relevante si el volumen estudiado es totalmente contenido dentro de una región bifásica bien definido de sólidos y el espacio, como una región del hueso trabecular. [26] En efecto, ya que el software diferencia solo las partes blancas y negras, estas deben corresponder a la parte vacía y sólida para que los resultados obtenidos tengan un sentido. En el caso de la espuma evaluada el valor BV/TV se refiere al porcentaje de hueso respecto al volumen total es decir 1-la porosidad.

➤ <sup>4</sup>SMI

El índice de la estructura del modelo indica que la prevalencia relativa de las barras y las placas en una estructura en 3D, como el hueso trabecular. SMI supone una medida de la convexidad de la superficie. Este parámetro es importante en la degradación de la osteoporosis del hueso trabecular, que se caracteriza por una transición de la placa-como a la arquitectura de tipo bastón. Un plato ideal del cilindro y la esfera tienen valores SMI de 0, 3 y 4, respectivamente. El cálculo del SMI se basa en la dilatación del modelo vóxel 3D, es decir, artificialmente, añadiendo una capa de espesor voxel a todas las superficies objeto binarizado (Hildebrand et al. 1997b)

$$SMI = \frac{6 \times (S' \times V)}{S^2} \quad (\text{Eq.3.})$$

La ecuación 3. Nos da el SMI. Donde S es el área de superficie del objeto antes de la dilatación y S 'es el cambio de superficie causada por la dilatación. V es el volumen inicial, objeto sin dilatar. Cabe señalar que las superficies cóncavas de las cavidades cerradas representan convexidad negativos al parámetro SMI, ya que la dilatación de un espacio cerrado reducirá la superficie causando S 'a ser negativos. Por lo tanto las regiones de hueso que contiene una prevalencia de caries cerrados - como son las regiones con un volumen relativa por encima del 50% - puede tener valores negativos SMI. Como consecuencia, el parámetro SMI es sensible a la importancia relativa, lo que puede acentuar las diferencias entre los grupos experimentales en el valor medido del SMI. [26]

➤ Tb.Th

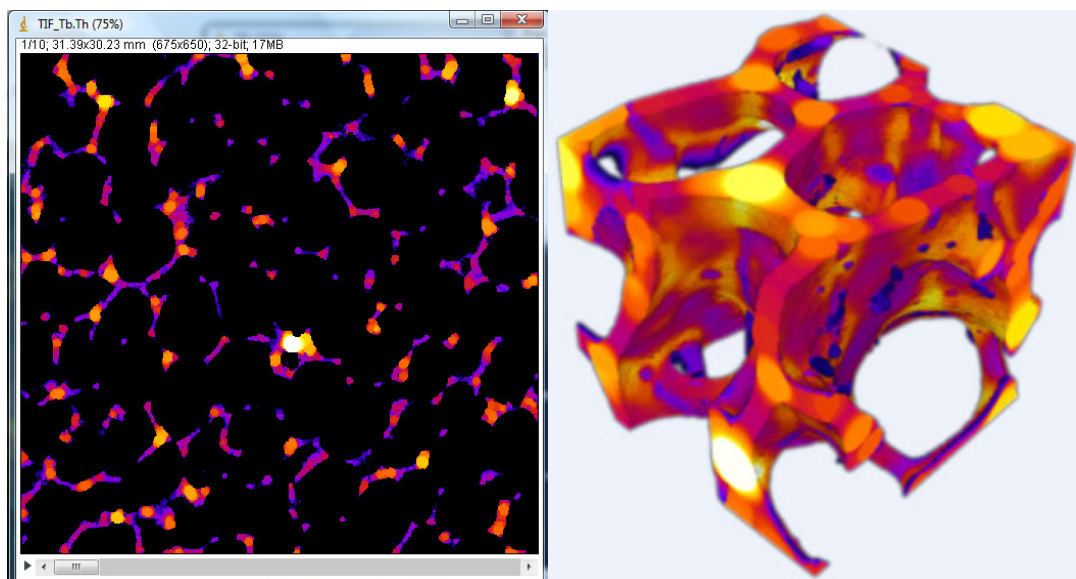
Con el análisis de imágenes 3D por micro-CT se puede medir un tridimensional espesor verdadero, que es independiente del modelo. Espesor local de un punto en el sólido se



define por Hildebrand y Rueggsegger (1997a) como el diámetro de la esfera más grande que cumple con dos condiciones:

1. La esfera encierra el punto (pero el punto no es necesariamente el centro de la esfera)
2. La esfera es totalmente delimitada dentro de las superficies sólidas.

(figura 38)



---

**Figura 36.** Representación de Tb.Th por *BoneJ*

Los colores brillantes (amarillo, naranja) representan regiones gruesas y colores oscuros (azul, violeta) representan más delgadas regiones.

Histomorfometristas suelen medir un solo valor promedio de hueso Tb.Th de un sitio de hueso trabecular. Sin embargo, un volumen de hueso trabecular - o cualquier otra región complejo objeto bifásico - también se puede caracterizar por una distribución de espesores.

Salidas CT-analizador de un histograma de espesor (y la separación también) con un intervalo de dos píxeles. Espesor de distribución es un poderoso método para la caracterización de la forma de una estructura compleja.

La estimación del Tb.Th a partir de mediciones bidimensionales una hipótesis sobre la natura de la estructura (a “modelo estructural”). Hay tres modelos sencillos de estructura:

- Modelo de platos paralelos

$$Tb.Th = \frac{2}{(BS/BV)} \quad (Eq.4.1.)$$

- Modelo de barras cilíndricas

$$Tb.Th = \frac{4}{(BS/BV)} \quad (Eq.4.2.)$$

- Modelo de esferas

$$Tb.Th = \frac{6}{(BS/BV)} \quad (Eq.4.3.)$$

#### ➤ TbSp

La separación trabecular es esencialmente el espesor de los espacios definidos por binarización dentro del VOI. Se mide Tb.Sp directa e independiente del modelo en 3D mediante el mismo método utilizado para medir el espesor trabecular, sólo aplicando al espacio en lugar de los voxels sólidos (figura 23). [26]

Esta también calculado con hipótesis de modelos

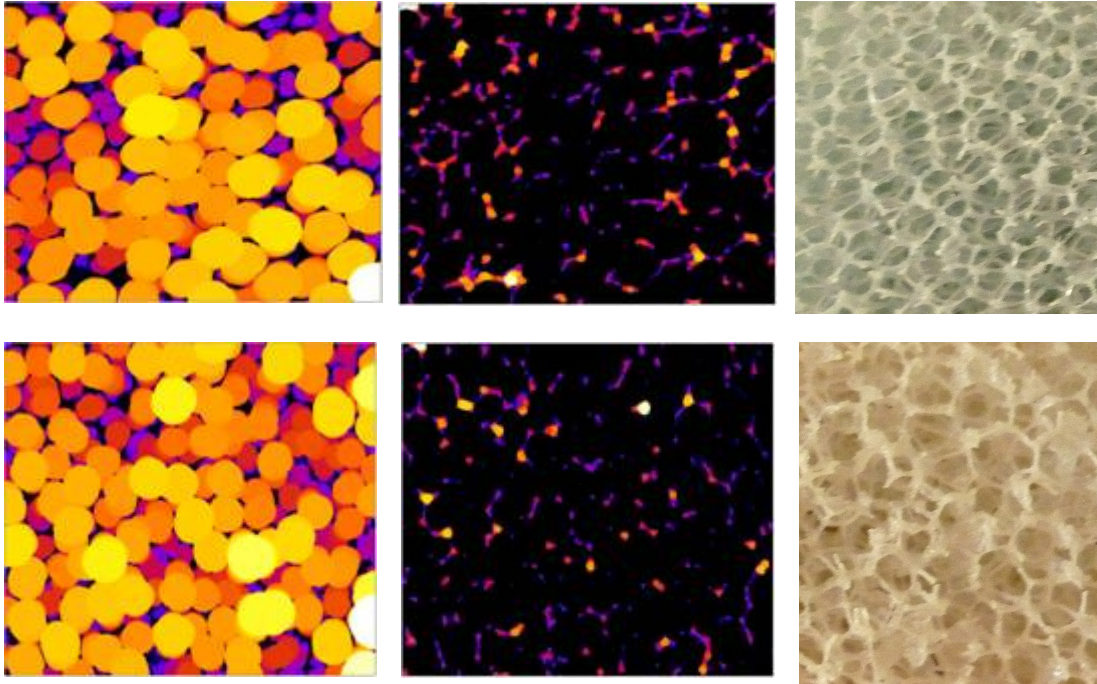
- Modelo de platos paralelos

$$Tb.Sp = \left( \frac{1}{Tb.N} \right) - Tb.Th \quad (Eq.5.1.)$$



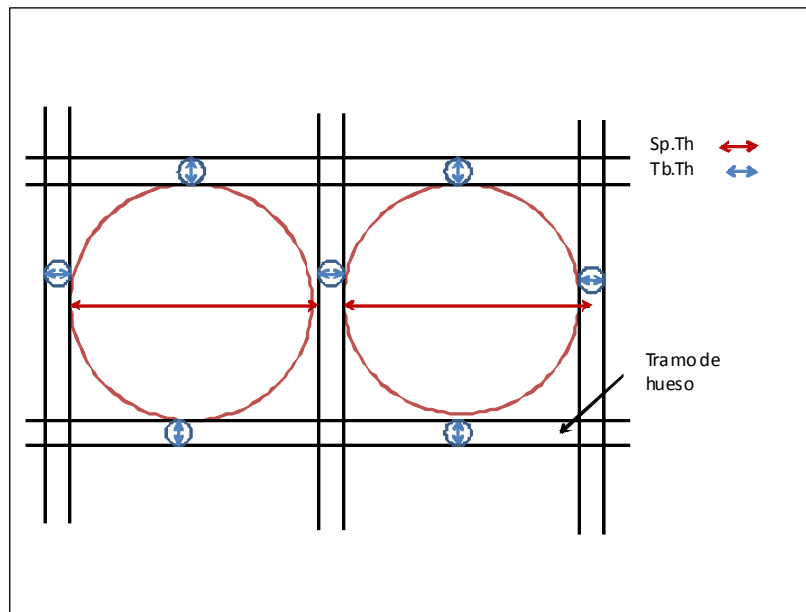
- Modelo de barras cilíndricas

$$Tb.Sp = Tb.Th * \left( \sqrt{\left( \frac{\pi}{4} * \frac{TV}{BV} \right)} - 1 \right) \quad (\text{Eq.5.2.})$$



**Figura 37.** Forma gráfica de representar el valor de la separación trabecular (Tb.Sp) y espesor trabecular (Tb.Th).

El esquema de abajo está hecho para que se tenga claro como se obtienen los dos parámetros Sp.Tb y Tb.Th



**Figura 38.** Esquema ilustrando las nociones de Sp.Tb y Tb.Th

➤ Tb.N

El numero trabecular o densidad de estructura lineal implica el numero de travesías a través de la estructura solida, como un hueso trabecular, hecho por unidad de longitud con un camino lineal aleatorio a través el volumen de intereso (VOI)

Las definiciones de los modelos de platos y barras del Tb.N tienen las valores de Tb.Th siguientes:

- Modelo de platos paralelos

$$Tb.N = \frac{\left(\frac{BV}{TV}\right)}{Tb.Th} \quad (Eq.6.1)$$

- Modelo de barras cilíndricas

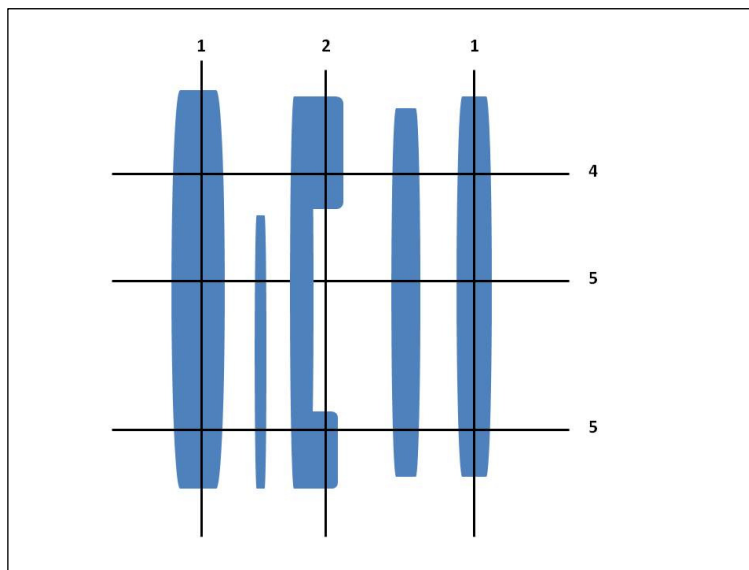
$$Tb.N = \frac{\frac{4}{\pi} * \frac{BV}{TV}}{Tb.Th} \quad (Eq.6.2)$$



➤ Grado de anisotropía

Un material isotrópico es un material cuyas propiedades físicas y en particular las mecánicas son las mismas independientemente de la dirección de análisis de este material. Hay que notar que el hueso esponjoso trabecular es anisotrópico. Su estructura corresponde a una organización espacial adecuada a las fuerzas aplicadas. El método MIL permite un análisis de la anisotropía de una muestra ósea. La medición del número de interfaces en las tres direcciones del espacio, podemos reconstruir una elipse en un espacio de dos dimensiones. El grado de anisotropía ( $DA = \text{grado de anisotropía}$ ) se define como el cociente entre el eje mayor y el más corto eje del elipsoide. Este fiscal es un elemento importante para explicar algunas de las propiedades mecánicas de las estructuras en tres dimensiones. Varios métodos han sido propuestos para el cálculo de la DA y MIL es el método uno. [22]

MIL método: Método de la longitud media de intercepción, consiste en trazar una línea a través del volumen de la imagen tridimensional conteniendo objetos binarizados, y dividiendo su longitud por el número de veces que la línea cruza una parte de la fase solida.



**Figura 39.** Esquema ilustrando el método de MIL

La ilustración de arriba explica como procede el método de MIL. Aquí hay dos líneas test que dan una pasada por la imagen. Se cuenta el número de intercepción con los sólidos.



	unidad	Símbolo	Definición	Formula *
<b>Superficie de hueso</b> ( <i>Bone Surface</i> )	mm	B.S	La superficie de todos los objetos sólidos dentro del VOI, medido en 3D (método de cubos marcha).	
<b>Volumen de hueso</b> ( <i>bone volumen</i> )	mm <sup>3</sup>	B.V	<sup>2</sup>	
<b>Volumen Total</b> ( <i>Tissue Volume</i> )	mm <sup>3</sup>	T.V	<sup>1</sup>	
<b>Espesor trabecular</b>	mm	Tb.Th		Tb.Th=2/(BS/BV) Tb.Th=4/(BS/BV) Tb.Th=6/(BS/BV)
<b>Fracción de Volumen trabecular óseo</b>		B.V/TV	<sup>3</sup> Numero de voxel identificados como hueso dividido por el número total de voxel en el volumen	
<b>Numero trabecular</b>	mm <sup>-1</sup>	Tb.N	Densidad trabecular	Tb.N=(BV/TV)/TbTh TbN=((4/π)*(BV/TV)) <sup>0.5</sup> /Tb.Th
<b>Separación Trabecular</b>	mm	Tb.Sp	Es la distancia entre los bordes de las trabéculas segmentadas	$Tb.Sp = Tb.Th * \left( \sqrt{\frac{S}{4} + \frac{TV}{BV}} - 1 \right)$ $Tb.Sp = \frac{1}{TbN} - Tb.Th$
<b>Índice de estructura del modelo</b>		SMI	<sup>4</sup>	SMI=6*(S*V)/S2
<b>Grado de anisotropía</b> ( <i>Degree of anistropy</i> )		DA		



\*Correlaciones comprobadas por Garrahan u Birkenhager)

➤ “plateness”

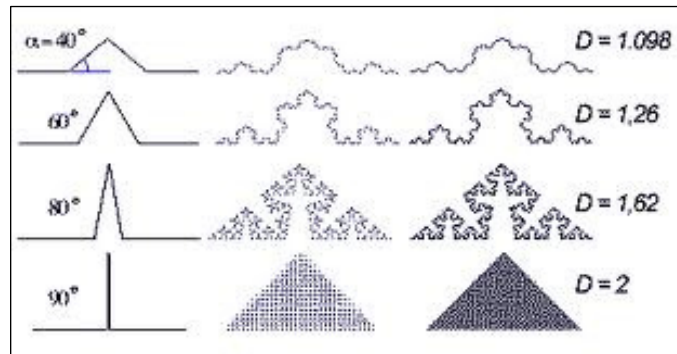
El índice de estructura del modelo (SMI) tiene algunas fallas conocidas, incluyendo que no representan superficies cóncavas. “Plateness” es un reemplazo experimental para el índice de modelo de estructura. Utiliza las longitudes de eje de esferoides prolato y oblatos para determinar si el espacio trabecular es mas prolato o oblatos e alrededor de un punto en particular. Los esferoides altamente prolato (en forma de jabalina, bastón), tienen un solo eje largo (a) y dos ejes cortos (b, c) tal que  $a \gg b > c$ , mientras que los esferoides muy prolato (en forma de disco, en forma de placa) tienen dos ejes más larga (a, b) y un eje mucho más corto (c) de modo que  $a > b > c$ . Por lo tanto,  $b/a$  se acerca a 0 para esferoides prolato y cerca de 1 para los esferoides oblatos, mientras que  $c/a$  normalmente está cerca de 0, excepto en más esferoides esférica ( $a \sim b \sim c$ ), cuando ambos  $b/a$  y  $c/a$  se acerca a 1. Plateness corre Skeletonise 3D, para obtener el eje medio de las trabéculas, que se utiliza como semilla para el muestrario. Unos vectores aleatorios son esparcidos de cada voxel sobre el eje intermedio hasta que cada vector haya golpeado un límite de fondo de primer plano Para cada voxel de semillas, una matriz de covarianza se construye a partir de los vectores veces su longitud. Valores propios resultados de la descomposición en una lista ordenada de las tres longitudes de eje. Las tres longitudes se suman todos los puntos de semillas para dar  $\Sigma a$ ,  $\Sigma b$  y  $\Sigma c$  (datos proporcionan por boneJ), de la que las proporciones relativas de las estructuras de la barra y placa puede deducirse. [22]

➤ Dimensión fractal

En repetidas ocasiones, el mundo tiene una irregularidad regular. Es por eso que Mandelbrot desarrolló una nueva geometría de la naturaleza: la geometría fractal. Las estructuras fractales son de un patrón particular cuya reproducción recursiva genera un invariante auto-similitud cual sea la escala de observación.

Por ejemplo, podemos encontrar con facilidad la dimensión fractal D de las curvas de Von Koch (tipo copo de nieve). Para la ilustración (figura 40) más abajo, se encuentra la ecuación

$D = \log(2) / \log(\cos^2 \alpha / 2)$  lo que da los valores que están a la derecha.



**Figura 40.** Dimensión fractal [23]

Sucesivamente, la figura de arriba muestra el patrón de “indentación” de cada segmento, una parcela después de tres o cuatro pasos y el trazado final de los fractales. Se obtuvieron valores cercanos a 1 para fractal de bajo relieve (primera línea), mientras que nos acercamos cada más de dos a medida que la curva se hace más compleja y ocupa más espacio en el que se dibuja. Para el caso límite  $\alpha=90^\circ$  para el que la curva rellena toda el triángulo, se obtiene  $D=2$ .

La dimensión fractal  $D$  es un parámetro que cuantifica la textura compleja de una estructura fractal de un objeto. Muchos elementos biológicos son tratados como objetos fractales para cuantificar la complejidad con la dimensión fractal. Desde el punto de vista matemático estos objetos no son objetos fractales perfectos sino muestran esta propiedad para un rango limitado de escalas. En el caso del cálculo de la dimensión fractal  $D$  de las muestras de espumas, el software ImageJ utiliza el método de “box counting” ( en imágenes binarias. Este método consiste en aplicar las redes de imágenes de diferentes tamaños de cajas de primaria de superficie  $\varepsilon \times \varepsilon$ . Si  $N(\varepsilon)$  es el número de cajas de lado  $\varepsilon$  necesarias para cubrir todo, entonces la dimensión box counting (se llama también la dimensión de Minkowsk) será (Eq.7):

$$\dim_{Box}(S) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log(1/\varepsilon)} \quad (\text{Eq.7.})$$



## Tutorial BoneJ

Los tres primeros pasos ya están explicados en el tutorial para obtener la porosidad

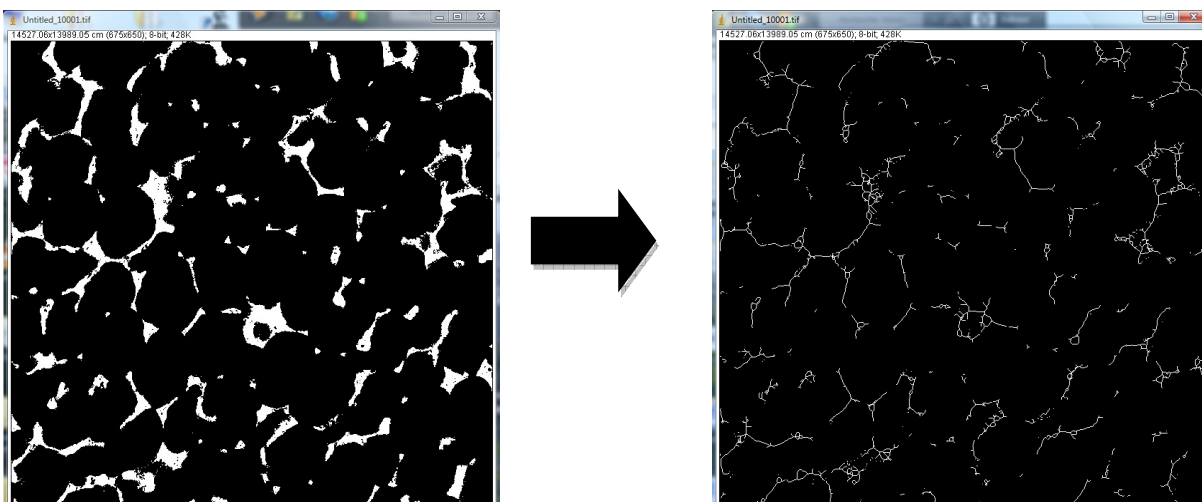
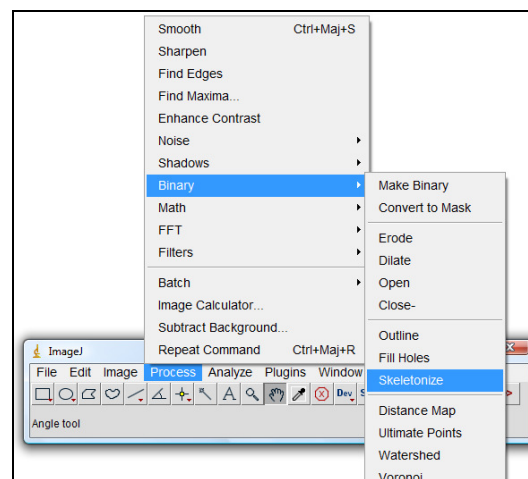
### Paso 1 Importación de imágenes

### Paso 2 Definición de la escala

### Paso 3 Binarización

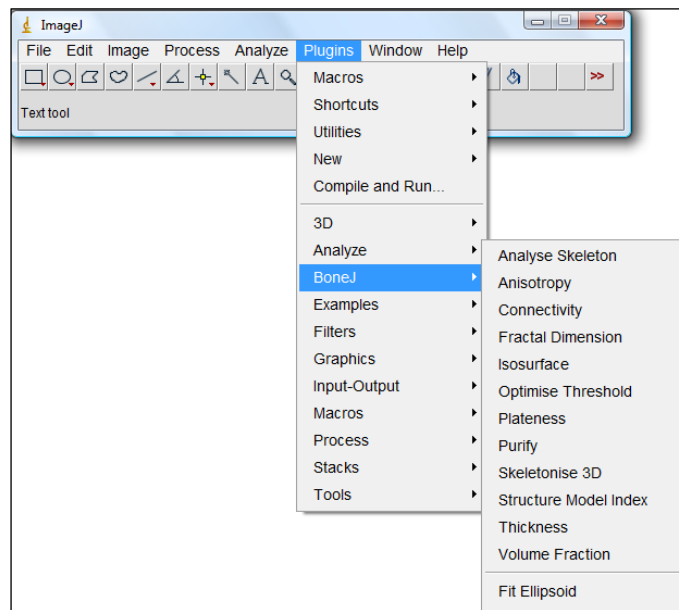
Cf 5.4.1

Para el cálculo de la conectividad y de la dimensión fractal se han utilizado la función “*skeletonize*” del software. Esto consiste en reducir a un único pixel la parte sólida y permite tener una mejor visualización de la conectividad por ejemplo. La conectividad es un parámetro importante ya que es lo que permite a los fluidos biológicos de fluir dentro del hueso. Además es un parámetro importante para la infiltración de cementos oseos durante la vertebroplastia.



**Figura 41.** Tutorial *BoneJ* Imagen binarizada antes y después el “*skeletonize*”

Para los demás no hace falta utilizar esta opción.

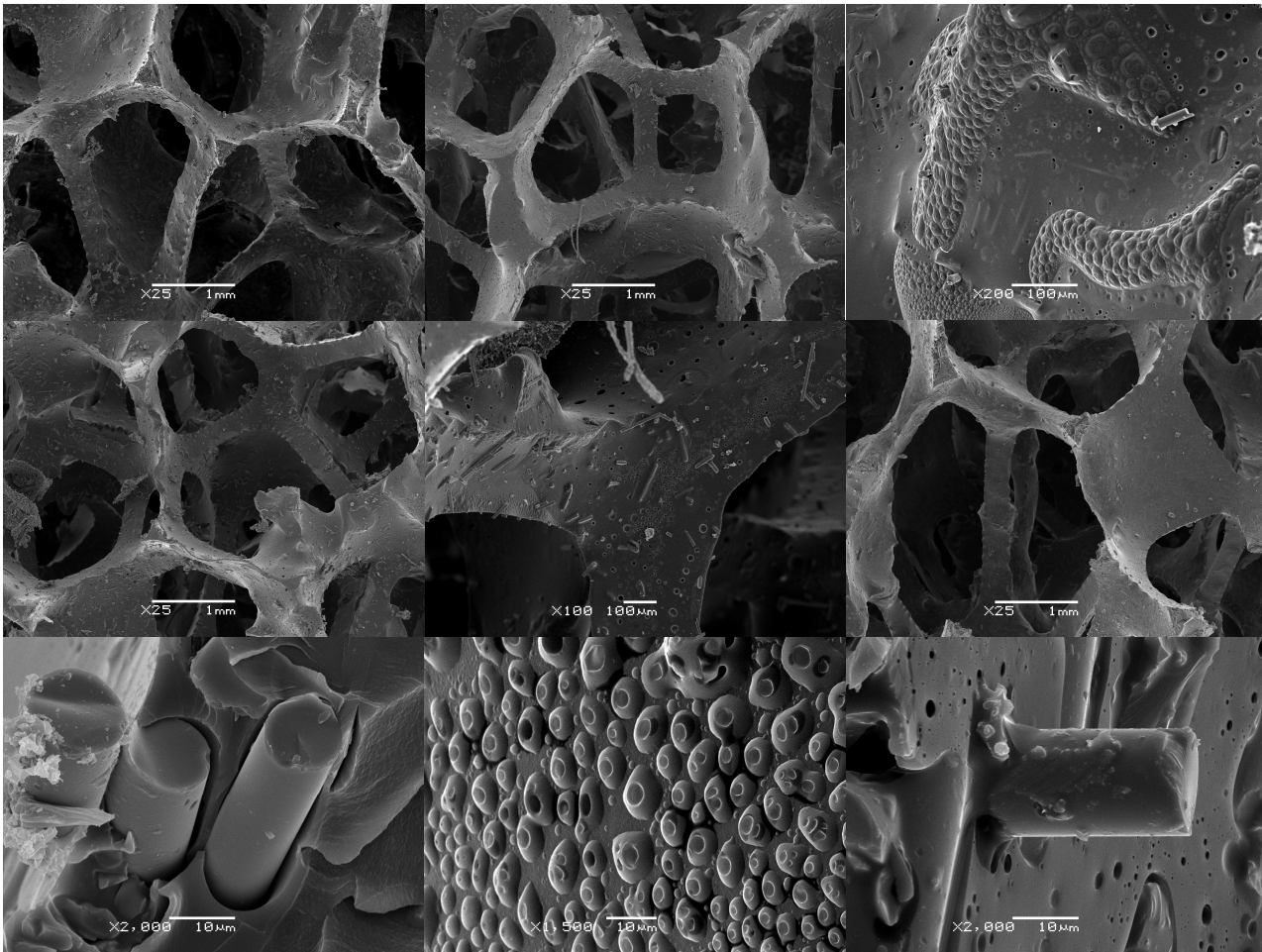


**Figura 42.** Tutorial *BoneJ* Opciones a disposición por *BoneJ*



## 6. Resultados y discusión

### 6.1. SEM

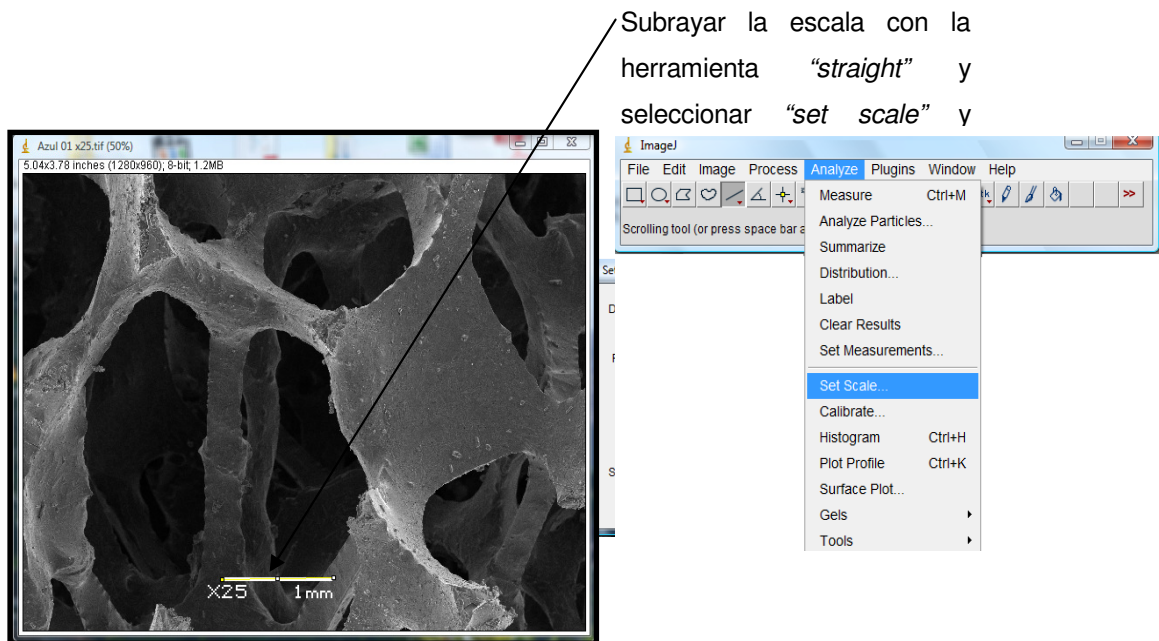


**Figura 43.** Imágenes de SEM de las espumas de poliuretano

Gracias a estas imágenes obtenidas con el SEM, se puede notar la microestructura de nuestras espumas. La porosidad abierta es la característica más importante de estas espumas y se puede verla a partir de una magnitud bastante baja (X25). Cuando se aumenta la magnitud, se notan las fibras de vidrio (X2000). Se puede ver las fibras de vidrio en la imagen c.

Con el software de tratamiento de imágenes se han hecho medidas como la superficie de los poros, el espesor trabecular et otros parámetros que nos permitirán tener una primera aproximación de los valores estos calculados de manera informatizada con la ayuda del plugin *BoneJ*.

La primera etapa importante es definir la escala. Para hacer eso, basta con trazar una recta sobre la escala de a imagen y utilizar el “set scale” para definir la correspondencia pixeles-milímetros.



**Figura 44.** Establecimiento de la escala de una imagen SEM

El paso siguiente es dibujar los contornos de los poros y utilizar la opción “*measure*” por fin de obtener una idea de los tamaños de los poros. Así, El software nos da la medida del área del poro dibujado



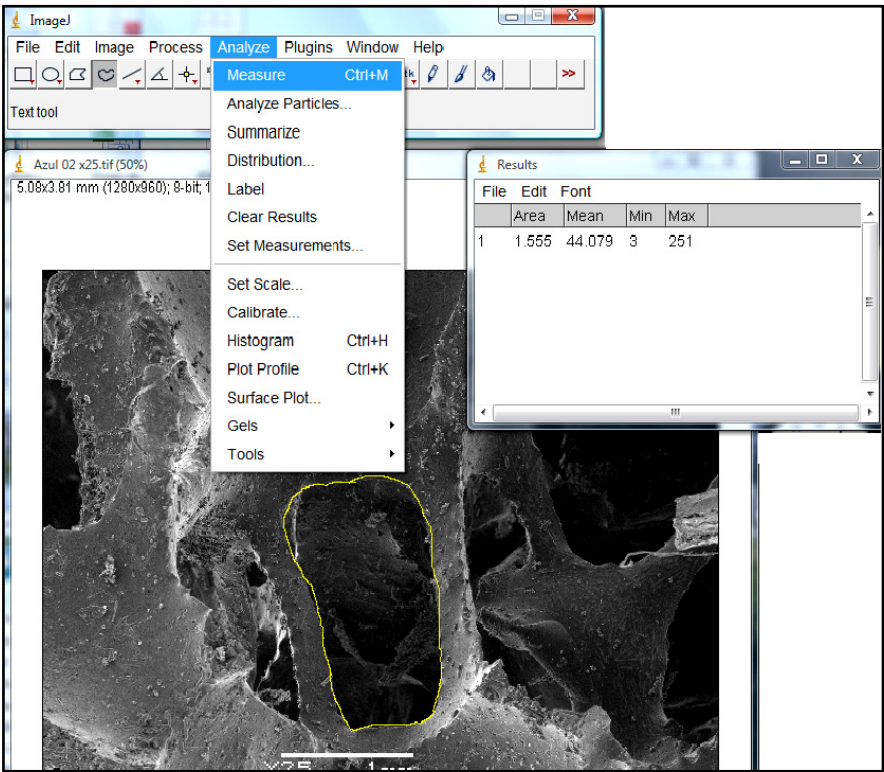


Figura 45 Dibujo de un poro con *ImageJ* sobre una imagen de SEM

Poro fino	Superficie de los poros (mm <sup>2</sup> )
media	1,595
max	3,060
min	0,727
Desviación estándar	0,686

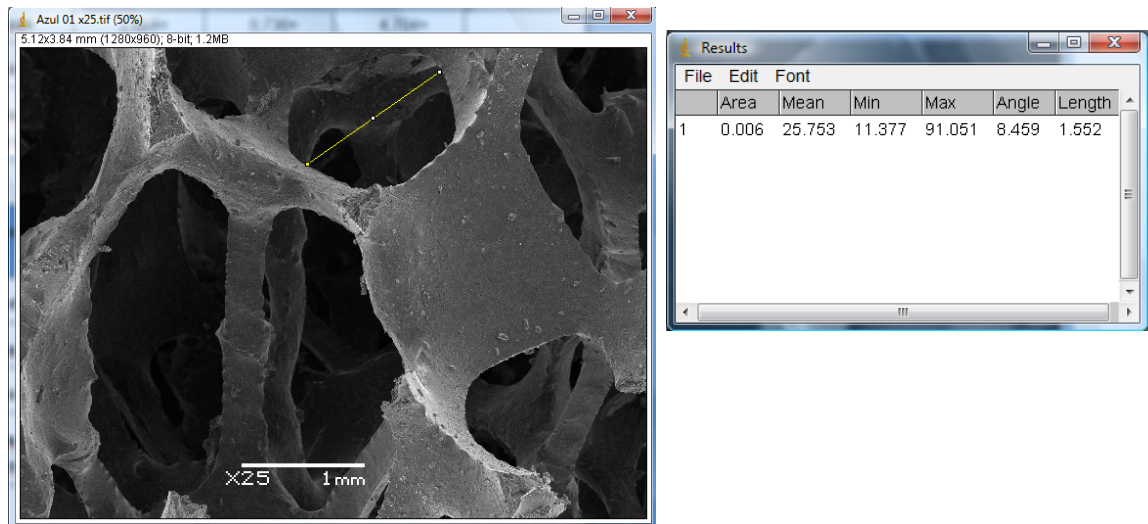
Poro grueso	Superficie de los poros (mm <sup>2</sup> )
media	1,462
max	2,696
min	0,684
Desviación estándar	0,686

Tabla 4. Superficie de los poros de las espumas (SEM)



Los resultados no se corresponden con lo esperado. En efecto, aquí es la espuma con poros pequeños/finos que tienen la superficie de poro más grande. Hay que notar que tenemos a disposición pocos imágenes explotables y por consiguiente es muy probable que una de las regiones estudiadas no están representativas de la muestra entera.

El parámetro que se ha medido después es el espacio trabecular Sp.Tb. Sólo se ha podido hacer con las imágenes X25 y no las de X100 porque en estas no se ven los poros enteros.



**Figura 46** Medición de la separación trabecular sobre imagen de SEM

Poro fino	Sp.Tb (mm)	Poro grueso	Sp.Tb (mm)
media	1,194	media	1,661
max	3,041	max	3,477
min	0,583	min	0,824
Desviación estándar	0,627	Desviación estándar	0,673

**Tabla 5.** Parámetro de Sp.Th de las dos espumas (SEM)



El parámetro Sp.Tb es la separación trabecular es decir la distancia entre dos tramos de hueso. Como se podía esperar, se obtienen parámetros de Sp.Tb más grande (Sp.Tb<sub>porogrueso</sub> es 28% más importante que Sp.Tb<sub>poro pequeño</sub> ) para la muestra con poros gruesos que los de la otra muestra. Dado que los poros que separan los tramos son gruesos, el Sp.Tb es más importante. De la misma manera se han también medido el espesor de los tramos es decir Tb.Th.

**Tabla 6.**Parametro Tb.Th de las dos espumas (SEM)

Poro fino	Tb.Th (mm)	Poro grueso	Tb.Th (mm)
media	0,333	media	0,299
max	0,589	max	0,468
min	0,256	min	0,227
Desviación estándar	0,061	Desviación estándar	0,0423

Los resultados corresponden a lo que se tenía que esperar. En efecto, aquí es la espuma con poros pequeños el espesor de trabecular más grande porque las paredes son más gruesas.

#### 6.1.1. Conclusiones

Hay que subrayar que con este método:

1. Dibujar a mano sobre imágenes de SEM no permite obtener muchos datos. La escala es demasiada pequeña y por tanto no se tiene una visión suficiente global de la espuma (hay pocos tramos que se pueden medir para cada imagen y encima

no hay muchas imágenes explotables). De hecho, los resultados pueden no ser muy representativos de toda la muestra (ej: la superficie de los poros).

2. Los parámetros que se pueden calcular con imágenes SEM son pocos (separación trabecular, espesor trabecular y superficie de los poros). Hay muchos parámetros muy importantes en la caracterización de un colido celular que no pueden ser evaluados tales como la porosidad, la conectividad...
3. Sin embargo, esto parece un buen método para tener una idea del orden de magnitud de estos parámetros. Eso se comprobara a continuación con la medición de estos mismos parámetros con otro método. En efecto, aunque se tengan pocos datos, la precisión de estos es suficiente para tener un orden de magnitud correcto. Este tipo de precisión se alcanza porque no hace falta tratar la imagen y perder informaciones con operaciones de erosión. Los ojos humanos pueden distinguir con precisión lo que es una pared o no.

## 6.2. Tomografía CAT

Las dos muestras de espuma han sido estudiadas mediante tomografía axial computerizada (TAC) en las instalaciones del Instituto de alta tecnología en el Parque de Investifacion Biomédica de Barcelona. La exploración con la técnica TAC genera unos ficheros que pueden ser estudiados mediante aplicaciones informáticas como MRIcro.

Cada imagen genera dos ficheros: un .img (image) con los datos propiamente dichos y un .hdr (header) que guarda la información asociada (tamaño de píxel etc.). Las imágenes obtenidas son de 512 x 512 x 93 (poro grueso) y de 512 x 512 x 129 (poro fino), con un tamaño de 0.19 x 0.19 x 0.63 mm (el máximo de resolución de nuestro escáner) y los datos están guardados como enteros de 16 bits. Las espumas han ido analizadas de dos puntos de vista. Uno por encima y el otro en un lado.





---

**Figura 47.** Imágenes de TAC de la espuma blanca



---

**Figura 48.** Imágenes TAC de la espuma azul

## 6.3. Microtomografía

### 6.3.1. Tratamiento de imágenes

### 6.3.2. Definición de la porosidad

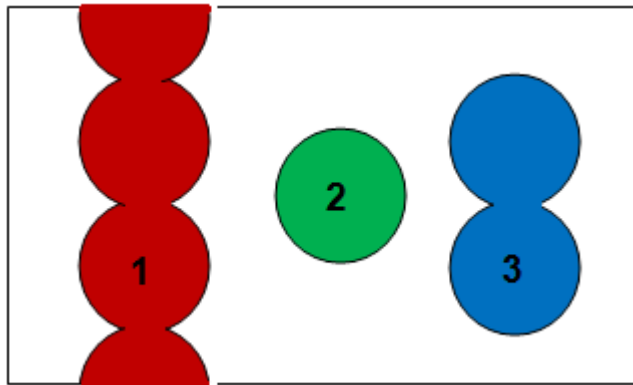
En nuestro caso se considera únicamente la porosidad ( $n$ ) como una propiedad física, es decir como un parámetro numérico, denominado también volumen poroso (IUPAC, 1994). Se define como el volumen ocupando los espacios vacíos ( $V_v$ ) por unidad de volumen total ( $V$ ), y se expresa en porcentaje:  $\text{porosidad} = (V_v / V) \times 100$

La porosidad admiten ciertas matizaciones y se establecen distintos tipos, siendo los principales: la "porosidad total" y la "porosidad abierta". De acuerdo con las características de los espacios vacíos contemplados, pueden considerarse otros tipos de porosidad: "cerrada", "accesible" a un determinado fluido, "comunicada", "efectiva" para un determinado comportamiento, etc. [27]

La porosidad total se define como el volumen total de vacíos por unidad de volumen total la muestra. En este caso deben contabilizarse todos los espacios vacíos presentes.

Respecto a la porosidad, es conveniente también precisar la noción de interconectividad entre los poros. Así, diferenciaremos tres tipos de porosidad: la porosidad interconectada abierta para la cual hay una conexión entre los poros y el exterior, la porosidad conectada cerrada, es decir que los poros están conectados entre ellos sin conexión con el exterior. Por fin, hay la porosidad aislada compuesta de poros aislados sin conexión entre ellos tampoco con el exterior. La imagen más abajo ilustra los tres tipos de porosidad.





**Figura 49.** Esquema de los tipos de porosidad

- 1 Porosidad interconectada abierta
- 2 Porosidad cerrada/aislada
- 3 Porosidad interconectada cerrada

La **porosidad** abierta se conoce también como porosidad accesible o comunicada, y se define de la misma forma como el volumen de poros abiertos ( $V_a$ ) o comunicados entre sí y con el exterior (accesibles al agua normalmente) por unidad de volumen total ( $V$ )

Esta porosidad se determina normalmente mediante técnicas experimentales, basadas en introducir un fluido en los poros y cuantificar su volumen. El procedimiento más común es el método de la pesada hidrostática ya mencionado, en dicho ensayo se saturan los poros con agua –normalmente al vacío– de acuerdo con las especificaciones de la norma seguida y se obtiene la porosidad abierta “accesible al agua”. Otro método utilizado es por inyección de mercurio, en este caso se introduce mercurio a presión en los poros y a partir del volumen inyectado se determina la porosidad abierta “accesible al mercurio”. En la mayoría de los casos, los valores obtenidos en ambos ensayos son parecidos, siendo ligeramente mayor la porosidad accesible al agua, ya que el mercurio no llega a introducirse en los poros muy pequeños ( $< 0,003 \mu\text{m}$ ), y dicho ensayo tampoco considera los poros con accesos muy grandes ( $> 100 \mu\text{m}$ ). [27]

La porosidad total es, por definición, el máximo valor de porosidad que presenta un material. En el caso ideal de que todos sus poros estén conectados con el exterior de la muestra, la porosidad total y la porosidad abierta coinciden.

Esta porosidad presenta gran interés en la caracterización de espumas ya que está relacionada con su capacidad de absorber un líquido, un cemento por ejemplo. La interconectividad entre los poros permitirá al cemento que fluye en el material.

La porosidad abierta es el parámetro más significativo de los huesos, ya que condiciona su capacidad para almacenar fluidos fluyendo.

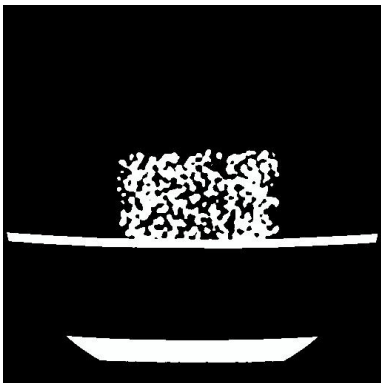
### 6.3.3. Determinación de la porosidad con *Micron Image Processing*

Utilizando las imágenes de TAC, se determinó la porosidad gracias a un software de tratamiento de imagen llamado *Micron Image Processing*. El procedimiento seguido es consiste diferenciar la superficie negra y blanca y determinar sus áreas respectivas.

```
Threshold Bitplane 1 from 0 to 161  
Invert Biplane 1 to bitplane 1  
Process frame origin at (150, 208), size of (223,110)  
Clear outside frame Bitplane 1  
Boolean Bitplane 4 or Bitplane 1 to Bitplane 6  
Clear outside Bitplane 1, Bitplane 4  
Booleane Bitplane 4 or Bitplane 1 to Bitplane 6
```

La porosidad pudo estar determinada solo para las imágenes “alzado” y no “planta por un problema de definición del nivel de gris. En efecto, hay que notar que la definición del nivel de gris juega un papel muy importante durante los tratamientos de imágenes.





**Figura 50.** Imagen de TAC de una espuma

La porosidad calculada con este método es la siguiente

	Espuma poro fino	Espuma poro grueso
Porosidad %	50,25	60,26

**Tabla 7.** Porosidad de las dos espumas medida con *Micron Image Processing*

La espuma de 0,09g/cm<sup>3</sup> con los poros gruesos tiene obviamente la porosidad la más elevada (60,26%). En efecto ya que tiene una densidad más baja que la otra, la parte vacía es más importante.

Sin embargo, estos resultados parecen demasiados bajos y deberían ser más altos de 30% por lo menos. A continuación, se notara que la porosidad medida con las imágenes de microCT, que es una técnica más precisa, es mucho más alta.



#### 6.3.4. Determinación de la porosidad con ImageJ

**N.B:** Cuando se guardan los resultados de *ImageJ* en fichero *Excel*, hay que cambiar los puntos en comas ( ctrl+B buscar punto y reemplazar por coma), sin embargo hay que vigilar porque unos de los puntos no van a volverse en comas.

La porosidad se puede calcular de dos maneras. La primera es utilizar la opción análisis de partículas (*Particules analyzer*) del imagen. El software *ImageJ* considera la parte solida como una partícula y mide su superficie.

La porosidad obtenida es la siguiente

	Poro fino	Poro grueso
Porosidad%	92,04	92,34

**Tabla 8.** Porosidad de las dos espumas medida con “*particle analyzer*”

El plugin BoneJ de ImageJ nos permite obtener directamente el ratio BV/TV es decir la proporción de hueso con respecto al volumen total de la muestra. Así, la porosidad se puede calcular haciendo la operación  $1 - \text{BV/TV}$ .

El parámetro BV/TV no se puede calcular para toda la muestra sin tener que hacerlo para trocitos de 30 imágenes. Se hará lo mismo para los otros parámetros que cuestan mucho a calcular. Así, se calcula el ratio BV/TV para un trocito de espuma de 30 imágenes es decir de anchura de 1,3485mm (29\*0,0465mm) sabiendo que la maquina trabaja con un pixel cubico de  $(0,0465)^3 \text{ mm}^3$ . Para ver mejor como se dispersen los datos se han calculados la valor media, la valor máxima et mínima y por fin la desviación estándar.



Porosidad	BV/TV (%)	Porosidad (%)
Media	8,6	91,4
Max	9,1	91,8
Min	8,2	90,9
Desviación estándar	0,25	0,25

Porosidad	BV/TV (%)	Porosidad (%)
Media	7,982	92,018
Max	9,300	92,700
Min	7,300	90,700
Desviación estándar	0,445	0,445

**Tabla 9.** Porosidad de las dos espumas medida con *BoneJ*

Método	TAC/ <i>Micron Image Processing</i>	$\mu$ CT/ <i>ImageJ particle analyzer</i>	$\mu$ CT/ <i>BoneJ</i> BV/TV
Porosidad poro grueso %	60,26	92,34	91,4
Porosidad Poro fino %	50,25	92,04	92,018

**Tabla 10.** Comparación de las porosidades medidas con varios métodos

Los resultados de porosidad obtenidos con *particle analyzer* y *BV/TV* son muy parecidos es decir alrededor de 90%. Se observan porosidades mucho más bajas con el *Micron Image Processing* (entre 50 y 60%). Esto puede ser debido a la resolución más baja de las imágenes de TAC y por eso, El software no logra bien distinguir la parte solida y vacía. La

erosión de la parte sólida de las imágenes de microCT durante el tratamiento de imágenes puede aumentar la diferencia entre los resultados.

#### 6.3.5. Conclusiones

La determinación de la porosidad se ha hecho con 3 métodos. Se puede deducir de los resultados obtenidos que:

1. La porosidad medida con las imágenes de TAC y de microCT son muy diferentes (porosidad de microCT 30% superior a las de TAC). Esto puede ser debido a la resolución más baja de las imágenes de TAC y por eso, el software no logra bien distinguir la parte sólida y vacía. Las operaciones de tratamiento de imagen pueden aumentar artificialmente los resultados de porosidad y exagerar la diferencia entre los resultados.
2. De cualquier manera, las espumas tienen una porosidad similar a la de un hueso trabecular que se sitúa entre 30 y 90% [28]
3. La porosidad obtenida con las imágenes de microCT parece más conveniente. Eso puede darse a la mejor precisión de las imágenes de microCT
4. Sin embargo, los tratamientos de imágenes que se deben efectuar sobre las imágenes de microCT antes de la medida (*limpieza, open, close...*) hacen perder una pequeña parte sólida que puede aumentar el clivaje entre la porosidad medida con imágenes de TAC y las de microCT. (cf figura 32 Imagen antes y después la limpieza)

### 6.4. Parámetros microestructurales y arquitecturales

La arquitectura de hueso esponjoso puede ser estimada con varios parámetros utilizados en histomorfometría. Los parámetros de estructura son calculados sobre imágenes binarias y los parámetros de conectividad sobre imágenes esqueléticas. Las imágenes originales estuvieron obtenidas con técnicas de análisis no destructivas (microtomografía y tomografía).



A continuación, vamos a comparar los parámetros obtenidos con las imágenes de TAC y las de micro tomografía. En fin se comparan los parámetros de la literatura para un hueso trabecular y una espuma.

Para facilitar la visualización de los resultados. Se pondrán los parámetros de la Espuma azul con poros pequeños dentro de tablas de color azul, los de la espuma blanca con poros gruesos en tablas de color rosa y por fin los datos de la literatura dentro de tablas gris.

Como ya se ha explicado, los parámetros proviene de una serie de cálculos sobre trocitos de 1,3485mm de anchura porque cuesta demasiado a la maquina calcular estos parámetros para números imágenes.

Antes de empezar a comentar los datos obtenidos, se definen los parámetros los más importantes y empleados en la caracterización de la espuma. Parámetros tales como BV/TV, Tb.Th, entre otros.

**BV/TV** es el parámetro que nos da la cantidad de hueso respecto a volumen total de la muestra estudiada. Con este parámetro ya se ha obtenido resultados de porosidad haciendo una sencilla diferencia. Es un parámetro muy importante que refleja la fuerza y el hueso la porosidad del medio.

**Tb.N:** es el número de tramos

**BS/TV** es el ratio de de la superficie sobre el volumen trabecular

**Tb.Th** es el espesor de los tramos

**Sp.Th** es la distancia entre los centros de los tramos.

**SMI** structure model index. Un valor de SMI de 0 y un SMI de 3, caracterizan una estructura ideal en placas = "*perfect plates*" y una estructura cilíndrica perfecta en vigas ( = *perfect rods*"). Este índice nos permite apreciar la arquitectura de la estructura y también caracterizar ciertos procesos como la osteoporosis, que se caracteriza por una evolución de una estructura de viga a una estructura la placa [29]

**DA** "Degree of anisotropy" .Isotropía es una medida de simetría en 3D o la presencia o ausencia de la alineación preferencial de las estructuras a lo largo de un eje de dirección en

particular. Dado que el grado de anisotropía es el ratio del eje más grande de una elipse con el otro, Cuanto más sea cerca de 0, mas anisotrópico sea el material.

#### 6.4.1. Comparaciones de parámetros entre las dos espumas

Ahora, se va a comparar cada parámetro entre las dos espumas.

<b>Poro grueso</b>	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BS (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	<b>BV/TV</b>	<b>BS/BV</b>
<b>media</b>	107,702	1351,322	590,239	0,437	0,080	5,485
<b>max</b>	125,404	1351,322	628,852	0,465	0,093	5,654
<b>min</b>	98,934	1351,322	543,702	0,402	0,073	5,015
<b>Desviación estándar</b>	5,885	0,000	24,992	0,144	0,004	0,144

**Tabla 11.** Parámetros BV, TV, BS para la espuma blanca

<b>*Poro fino</b>	<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>BS (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>BS/TV(mm<sup>-1</sup>)</b>	<b>BV/TV</b>	<b>BS/BV</b>
<b>media</b>	112,371	1308,766	635,696	0,486	0,086	5,661
<b>max</b>	120,088	1323,490	676,065	0,518	0,091	6,035
<b>min</b>	94,681	1102,851	571,427	0,454	0,082	5,452
<b>Desviación estándar</b>	5,390	52,427	25,239	0,0181	0,003	0,137693

**Tabla 12.** Parámetros BV, TV, BS para la espuma azul medidos con *BoneJ*



El TV corresponde al volumen de los trocitos considerados de 30 imágenes. Las imágenes de la espuma azul con poros finos son de dimensiones  $32,55 \times 29,76 \text{ mm}^2$  para la espuma blanca de poros gruesos y  $31,39 \times 30,23 \text{ mm}^2$  y los trocitos estudiados son de  $0,0465 \text{ mm} \times 29$  es decir  $1,3485 \text{ mm}$ . Los trocitos de la espuma azul son de volumen total de  $32,55 \times 29,76 \times 1,3485 \text{ mm}^3$  o sea  $1306,28 \text{ mm}^3$ . El BV corresponde al volumen de parte sólida así la espuma con poros finos tiene un BV más importante que la otra de 4% más o menos.

Poros grueso	Tb,Th Media (mm)	Tb,Th Std Dev (mm)	Tb,Th Max (mm)
media	0,382	0,173	0,967
max	0,402	0,189	1,187
min	0,296	0,156	0,857
Desviación estándar	0,024	0,010	0,081

**Tabla 13.** Parámetro de Tb,Th para espuma azul medido con *BoneJ*

Poros fino	Tb,Th Media (mm)	Tb,Th Std Dev (mm)	Tb,Th Max (mm)
media	0,316	0,143	0,824
max	0,327	0,150	0,997
min	0,306	0,135	0,726
Desviación estándar	0,006	0,004	0,066

**Tabla 14.** Parámetro Tb,Th de la espuma azul medido con *BoneJ*

Lo que se puede decir primero es que el orden de tamaño dado con la técnica del SEM es correcto.

Método	SEM/ ImageJ	μCT/ BoneJ
<b>Tb.Th Poro grueso (mm)</b>	0,299	0,382
<b>Tb.Th Poro fino (mm)</b>	0,333	0,316

---

**Tabla 15.** Comparación de los Tb.Th obtenidos con varios métodos

Con las imágenes de microCT, la espuma con poros gruesos tiene un espesor de los tramos mayor de 17% al de la espuma con poros finos. Se esperaba el reverse porque Las paredes de los poros de la espuma azul con poros finos son más gruesas. A lo mejor, eso es debido a las operaciones que se hacen sobre las imágenes de microCT. En efecto, la binarización por ejemplo está basada en un umbral de valor de gris. Puede que para las imágenes de la espuma azul esta operación ha quitado suficiente de parte sólida de la imagen para que las paredes de los tramos se adelgacen demasiado.

Sin embargo, las medidas con las imágenes de SEM son en adecuación con lo que se esperaba.



Poro grueso	Tb,Sp Media (mm)	Tb,Sp Std Dev (mm)	Tb,Sp Max (mm)
media	2,553	0,659	3,910
max	2,684	0,736	4,704
min	1,869	0,625	2,771
Desviación estándar	0,184	0,024	0,458

---

**Tabla 16.** Parámetro Sp.Tb de la espuma blanca medido con *BoneJ*

Poro fino	Tb,Sp Media (mm)	Tb,Sp Std Dev (mm)	Tb,Sp Max (mm)
media	2,438	0,814	3,946
max	2,639	0,865	4,849
min	2,218	0,774	3,627
Desviación estándar	0,09713	0,023	0,284

---

**Tabla 17.** Parámetro Sp.Tb de la espuma blanca medido con *BoneJ*



Método	SEM/ ImageJ	$\mu$ CT/ BoneJ
Sp.Tb Poro grueso (mm)	1,661	2,553
Sp.Tb Poro fino (mm)	1,194	2,438

**Tabla 18.** Comparación del Tb.Sp obtenido con varios métodos

Los resultados obtenidos con los dos métodos son bastante diferentes. Hay que recordar que los datos de SEM están obtenidos para un trocito muy pequeño de las espumas (los datos obtenidos son pocos, una veintena de datos para cada una de las espumas) mientras que, con BoneJ, es la espuma entera que esta estudiada. La separación trabecular medida sobre la imágenes de SEM pueden estar medidas a un lugar donde la separación trabecular es pequeña y no representativa del resto de la espuma. Sin embargo, el SpTb de la espuma con poros gruesos queda en los dos casos más elevado que el de la otra espuma con poros finos. Este tiene sentido, ya que los poros separan los tramos y así si estos son gruesos, los espacios entre los tramos son más importantes.

Poro grueso	Dimensión Fractal	Poro fino	Dimensión Fractal
media	1,969	media	2,012
max	2,181	max	2,064
min	1,729	min	1,969
Desviación estándar	0,080	Desviación estándar	0,023

**Tabla 19.** Parámetro de dimensión fractal de las dos espumas medido con *BoneJ*



Respecto a la dimensión fractal, las dos espumas tienen una dimensión fractal casi igual y aproximativamente igual a 2. Es decir que la microarquitectura tiene un estado superficie de igual.

<b>Poro grueso</b>	<b>Densidad de conectividad (mm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Poro pequeño</b>	<b>Densidad de conectividad (mm<sup>-3</sup>)</b>
<b>media</b>	3,423	<b>media</b>	9,550
<b>max</b>	4,189	<b>max</b>	10,939
<b>min</b>	2,696	<b>min</b>	8,221
<b>Desviación estándar</b>	0,384	<b>Desviación estándar</b>	0,596

---

**Tabla 20.** Parámetro de densidad de conectividad de las dos espumas medido por *BoneJ*

Para calcular estos parámetros, se hizo con antelación un paso de esquelitización con la opción “*skeletonize*” de software *ImageJ*

Entonces, el espesor de los tramos se reducirá a ser representado por un solo píxel. Este paso llamado “adelgazamiento” identificará el número de nodos, sino también los extremos libres de las mediciones de distancia (nodo a nodo, el nodo de extremo libre, extremo libre al extremo libre). Se divide el número de conexiones por el volumen para obtener la densidad de conectividad.

La densidad de conectividad para la espuma con poros finos es casi tres veces más grande que el de la otra espuma con poros gruesos. Dado que, la espuma tiene poros

más pequeños. Hay más poros que en la otra espuma donde son de mayor tamaño. Así hay más interconectividades entre los tramos.

Poro grueso	$\Sigma eV2/\Sigma eV1$	$\Sigma eV3/\Sigma eV1$	SMI	DA
media	0,389	0,269	3,529	0,373
max	0,578	0,330	5,285	0,520
min	0,311	0,229	1,888	0,289
Desviación estándar	0,063	0,026	0,911	0,068

**Tabla 21.** Parámetros de vectores propios, SMI y DA de la espuma blanca medidos con *BoneJ*

Poro fino	$\Sigma eV2/\Sigma eV1$	$\Sigma eV3/\Sigma eV1$	SMI	DA
media	0,534	0,336	3,166	0,326
max	0,567	0,365	5,084	0,433
min	0,494	0,295	0,618	0,235
Desviación estándar	0,018	0,016547	1,061	0,055

**Tabla 22.** Parámetros de vectores propios, SMI y DA de la espuma azul medidos con *BoneJ*

La anisotropía de la microestructura de un sólido es un parámetro muy importante que desempeña un gran papel en sus propiedades mecánicas. La orientación de la estructura trabecular fue descrito por la dirección principal de las trabéculas y el grado de anisotropía. Con este fin, se calculó un tensor de la talla media interceptar mediante el ajuste de un elipsoide de las mediciones de la MIL longitud media de intersección (Harrigan y Mann,



1984). El grado de anisotropía es aproximadamente lo mismo para las dos espumas (entre 0,3 y 0,4)

El SMI para las dos muestras se sitúa entre 3 y 4 así que se puede asimilar la microarquitectura de los tramos a vigas. Se confirma la utilización del método de las vigas de para calcular los parámetros. Gracias al parámetro SMI, se sabe que los tramos de las espumas se pueden asimilar a bastones. Así, se puede calcular el número trabecular usando la formula. Sin embargo, los ratios  $\Sigma eV2/\Sigma eV1$  (relación de medio a menor longitud del eje) son alrededor de 0,5 y  $\Sigma eV3/\Sigma eV1$  (relación más corta a las longitudes de eje central) se acerca de 0 (0,2-0,3) para las dos espumas. Así, podemos deducir que la geometría no solo se puede asimilar a barras sino a una geometría más compleja entre barras y placas.

Vamos a utilizar la formula de hipótesis de vigas para obtener el numero trabecular

$$Tb.N = \frac{4}{\pi} \cdot \frac{BV}{TV} \cdot \frac{1}{Tb.Th} \quad (Eq.6.2)$$

Poro fino	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
Media	0,346
Max	0,372
Min	0,323
Desviación estándar	0,012

Poro grueso	Tb.N (mm <sup>-1</sup> )
Media	0,265
Max	0,265
Min	0,265
Desviación estándar	0,265

---

**Tabla 23.** Parámetro Tb.N de las dos espumas medido con *BoneJ*

La espuma con pequeños poros (Espuma azul) tiene un número de tramos por longitud superior a la otra espuma. Eso puede parecer lógico ya que como los poros son pequeños en la espuma azul, hay mas poros y de hecho mas tramos.

#### 6.4.2. Comparación de los parámetros de microarquitecturas de las espumas con los de huesos reales

Ahora se va a comparar los datos de los modelos de espuma de poliuretano con datos de hueso reales publicados en el artículo "*Mechanical properties of open-cell foam synthetic thoracic vertebrae*" de Amy E. Johnson & Tony S. Keller.

La espuma de baja densidad ha concommitante menor BV / TV, La comparación con los datos en humanos se presentan en la Tabla, BS / BV está dentro del rango entre dos evaluaciones diferentes del hueso trabecular vertebral y Tb.N es ligeramente inferior. Aunque Tb.Th y Tb.Sp son más altos, la proporción de Tb.Th / Tb.Sp se mantiene entre la espuma de célula abierta y el hueso vertebral. El MIL más alto para cada eje refleja la separación relativamente grande entre las trabéculas y el grosor de las trabéculas. Por otra parte, el hueso trabecular humano tiene una densidad aparente que van desde 0,05 hasta 0,30 g / cm<sup>3</sup> que corresponde a una fracción del volumen que van desde 0.03 hasta. (asumiendo una densidad de tejido óseo de 1,9 g / cm<sup>3</sup>)

Las dimensiones fractales de las espumas han sido comparadas en la tabla mas abajo con datos publicado en el artículo "*fractal dimensión and architecture of trabecular bone*" de N.L Fazzalari y I.H Parkinson. La dimensión fractal de los modelos de hueso es casi el doble de la de los huesos trabeculares considerados. La dimensión fractal da informaciones sobre el estado de la superficie. Esto significa que la superficie de los huesos trabeculares es mas aspera que la de las espumas de poliuretano. En efecto, La superficie del mineral del hueso trabecular es la interfaz con las células que transforman la estructura ósea. La superficie es el sitio para los osteoblastos y los osteoclastos y la actividad de las células en la medida de superficie medida es una variable independiente para estimar los parámetros estructurales que describen la arquitectura del hueso esponjoso. La investigación de la dimensión fractal del hueso trabecular tanto, es esencial para la descripción fiable de esta estructura, que depende de los cambios en la medida en la superficie con el fin de transformar su arquitectura.



Parámetros morfológicos	Espuma porosidad abierta 0,09g/cm <sup>3</sup> Poro grueso	Espuma porosidad abierta 0,12g/cm <sup>3</sup> Poro fino	Hueso vertebral Steffen and Keller (n=8, L1-L5)	Hueso vertebral Cvijanovic (n=48, L3)
BV/TV	0,080	0,086	0,07-0,13	0,09-0,18
BS/BV	5,485	5,661	10,51-13,24	2,1-3,4
TB.N	0,265	0,346	0,48-0,74	1,0-1,7
Tb.Th	0,382	0,316	0,15-0,19	0,08-0,13
Tb.Sp	2,553	2,438	1,16-1,91	0,45-0,90
MIL.1	0,389	0,534	0,38-0,50	
MIL.2=	0,269	0,336	0,036-0,45	
MIL.3	0,373	0,326	0,30-0,41	
TCI (mm <sup>-1</sup> )			0,08-0,26	

**Tabla 24.** Comparación parámetros de las espumas con los de huesos trabeculares [22]

	Espuma porosidad abierta 0,09g/cm <sup>3</sup> Poro grueso	Espuma porosidad abierta 0,12g/cm <sup>3</sup> Poro fino	Hueso trabecular n=24
Dimensión fractal	1,969	2,012	1,195

**Tabla 25.** Comparación de la dimensión fractal de las espumas con datos de huesos trabeculares

### 6.4.3. Conclusiones

Esta capítulo ha permitido tener muchas informaciones esenciales a la caracterización de un sólido poroso como los modelos de hueso. Se puede concluir de esta parte que:

1. Aunque se tenían pocos datos para las imágenes de SEM, los datos obtenidos eran en adecuación con los encontrado a continuación con boneJ
2. Las imágenes de micro CT permiten medir la porosidad con más precisión que las de TAC
3. Las dos espumas tienen la misma microestructura global (los parámetros quedan en un mismo orden de tamaño, las variaciones son pequeñas y son dadas a la diferencia de tamaño de poro entre cada una.
4. El nivel de gris es una noción muy importante. Sobre todo durante las operaciones de tratamiento de imagen. Un umbral de gris mal definido puede alcanzar a una pérdida de informaciones sobre las imágenes.

La comparación de los datos obtenidos para los modelos de hueso de poliuretano y los de la literatura permiten afirmar que:

1. El software de tratamiento de imagen ImageJ y su plugin BoneJ permiten obtener valores explotables
2. Los modelos de hueso de poliuretano tiene una microarquitectura y parámetros morfológicos similares a los de un hueso real



## **7. Impacto ambiental**

En este proyecto se han realizado principalmente simulaciones por ordenador. El impacto ambiental es el que se corresponde con el gasto de energía eléctrica utilizada para llevar a cabo los cálculos de tratamiento de las imágenes. Por parte de este estudiante se ha minimizado el posible impacto ambiental de este proyecto reduciendo al mínimo el uso de papel antes de la publicación final de este proyecto.



## 8. Costes

Para el sistema informático se han tomado en cuenta los precios iniciales de los 2 ordenadores utilizados así como los costes del programa y una licencia. Se toma en consideración el tiempo de amortización y se puede deducir el precio por hora.

Concepto	Evaluación del coste horario de los recursos informáticos			
	Coste(€)	Tiempo de amort.(a)	Coste Anual(€/a)	Coste Día(€/d)
Workstation HP xw4400	1200	4	300	0,82
HP pavillon	1300	2	600	1,64

Concepto	Coste asociado a la utilización del equipamiento informático		
	Coste Día (€/d)	Días de utili.	Coste (€)
Workstation HP	0,82	90	73,80
HP pavillon	1,64	160	262,40
<b>COSTE INFORMATICO Y DE MAQUINA</b>			<b>336,2</b>

No se ha utilizado material de laboratorio

El coste de material de oficina es el que se detalla a continuación:



Material	Coste asociado a material de oficina		
	Coste por unidad (€/u)	Unidades	Coste (€)
Bolígrafos	1	3	3
Cuaderno	1	1	1
Hojas impresora	0,02	500	10
CD's	0,70	5	3,50
Impresiones	30	2	60
Encuadernación	3	2	6
<b>COSTE DEL MATERIAL DE OFICINA</b>			<b>83,50 €</b>

Por último, el coste asociado a personal, se ha calculado tomando como base que se ha trabajado 5 días a la semana, a 6 h/d en la universidad con la ayuda de un catedrático universitario y un doctorando. El precio por hora de un ingeniero superior es de 20€/h, para un catedrático universitario es de 70€/h y para una doctorando es de 30€/h.

Fases del proyecto	Coste asociado al personal				
	Días	Horas / Ing	Horas/Cat.Uni	Horas/Doct	Coste (€)
Análisis preliminar	15	90	10	-	2 500
Estudio bibliográfico	15	90	-	5	1 950
Creación de modelos	45	270	20	-	6 800

Ajuste del programa	25	150	15	-	4 050
Ensayos	2	12	-	12	600
Análisis de resultados	15	90	30	-	3 900
Elaboración informe	45	270	40	20	8 800
<b>Subtotal 1 Ing.</b>	-	972	-	-	<b>19 440</b>
<b>Subtotal 1 Cat. Uni.</b>	-	-	115	-	<b>8 050</b>
<b>Subtotal 1 Doct.</b>	-	-	-	37	<b>1 110</b>
<b>SUBTOTAL 3 PERSONAS</b>					<b>28 600€</b>

A continuación el coste general de este proyecto:

Conceptos	Costo asociado (€)
Equipamiento informático y maquina	336,2
Material de oficina	83,50
Recursos humanos	28 600
<b>COSTE TOTAL DEL PROYECTO</b>	<b>29019,7 €</b>



## 9. Conclusiones

Durante este proyecto se han llegado a unas conclusiones muy importantes. La determinación de parámetros morfológicos sobre imágenes de SEM ha permitido decir que:

1. El dibujar a mano los parámetros sobre imágenes de SEM no permite tener una visión suficiente global de la espuma (hay pocos tramos que se pueden medir para cada imagen y encima no hay muchas imágenes explotables).
2. Los parámetros que se pueden calcular con imágenes SEM son pocos. Hay muchos parámetros muy importantes en la caracterización de un colido celular que no pueden ser evaluados tales como la porosidad, la conectividad...
3. Sin embargo, esto parece un buen método para tener una idea del orden de magnitud de estos parámetros.

La porosidad es un parámetro que juega un papel importante en las propiedades de solios celulares tales como los modelos de hueso estudiados. De hecho, la determinación de la porosidad se ha hecho con 3 métodos. Se puede deducir de los resultados obtenidos que:

1. La porosidad medida con las imágenes de TAC y de microCT son muy diferentes. Esto puede ser debido a la resolución más baja de las imágenes de TAC y por eso, el software no logra bien distinguir la parte solida y vacía. Las operaciones de tratamiento de imagen puede también aumentar artificialmente los resultados de porosidad por erosión y exagerar la diferencia entre los resultados.
2. La porosidad obtenida con las imágenes de microCT parecen más conveniente. Eso puede ser debido a la mejor precisión de las imágenes de microCT.

El ultimo capitulo ha permitido tener muchas informaciones esenciales a la caracterización de un sólido poroso como los modelos de hueso. Se puede concluir de esta parte que:

1. Aunque se tenían pocos datos para las imágenes de SEM, los datos obtenidos eran en adecuación con los encontrados a continuación con *BoneJ*

2. Las dos espumas tienen la misma microestructura global (los parámetros quedan en un mismo orden de tamaño, las variaciones son pequeñas y son dadas a la diferencia de tamaño de poro entre cada una.
3. El nivel de gris es una noción importante. Sobre todo durante las operaciones de tratamiento de imagen cuando puede ocurrir una erosión de la imagen. Un umbral de gris mal definido implica una pérdida de información sobre las imágenes.

La comparación de los datos obtenidos para los modelos de hueso de poliuretano y los de la literatura permiten afirmar que:

1. El software de tratamiento de imagen *ImageJ* y su *plugin BoneJ* permiten obtener valores explotables
2. Los modelos de hueso de poliuretano tiene una microarquitectura y parámetros morfológicos similares a los de un hueso real

Para Este proyecto ha permitido entender los métodos con los cuales, un software de tratamiento de imágenes como *ImageJ* podía analizar una imagen (MIL, *box counting*,...). Las ventajas de estos tipos de tratamiento es el costo bajo y la obtención de un número importante de datos de manera mecanizada.

Sin embargo, el tratamiento de imágenes tiene una debilidad que es la definición del nivel de gris y las operaciones que se deben hacer sobre las imágenes para tener los datos. En efecto, eso puede alcanzar a una pérdida de informaciones.

Pueden obtenerse modelos en 3D para realizar simulaciones por elementos finitos o reconstrucción de modelos reales escalados mediante técnicas de prototipado rápido

Además, durante este PFC, la microestructura de los modelos de hueso ha sido caracterizada permitiendo una comparación con datos de huesos reales. La conclusión la más importante de este PFC es que los modelos de espuma tienen una microestructura similar a la de un hueso trabecular real. La microestructura es íntimamente vinculada a las propiedades mecánicas. De hecho, esta primera etapa de caracterización es solo un de un trabajo que consistirá a la evaluación de las propiedades mecánicas y a la evaluación del comportamiento de cementos dentro de estos modelos.



## 10. Agradecimientos

En primer lugar quería agradecer a la *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona* (ETSEIB) y a la *Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona* (EUETIB) y particularmente al *Grup de Recerca Interdepartamental per a la Col.laboració Científica Aplicada* (GRICCA - EUETIB) por poner a mi disposición sus laboratorios y sobretodo su conocimiento y su tiempo.

En segundo lugar quería agradecer a tres personas concretas del *Grup de Recerca Interdepartamental per a la Col.laboració Científica Aplicada* (GRICCA - EUETIB) por su ayuda, paciencia y consejo: agradezco al profesor Enrique Fernández por su ayuda para llevar a cabo este proyecto; agradezco también al profesor Ricardo Torres por su paciencia infinita y su ayuda durante todas las fases de este proyecto, y por último agradezco a Sergio Gomez por su ayuda sus explicaciones, su paciencia y sus consejos.

## 11. Bibliografía

### 11.1. Referencias bibliográficas

- [1] (<http://www.asbmr.org/default.aspx>)
- [2] Grupo de trabajo de calidad y resistencia ósea *SEIOMM*
- [3] <http://www.infodoctor.org/www/meshg.htm?idos=37439>
- [4] [www.wikipedia.es](http://www.wikipedia.es)
- [5] Curso de biomateriales sobre los hueso 2009 2010 Elisabet Engel López, ETSEIB
- [6] (Copyright © 2003 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings)
- [7] Hall, Susan. *Basic Biomechanics*. Fifth Edition. Pg. 88
- [8] M.C. BRUGUERAS. La osteoporosis, una amenaza para el tercer milenio.  
<http://www.sld.cu/aldia/archivos/tendencias/tend7.html>
- [9] <http://www.bartleby.com/107/>
- [10] SCANCO MEDICAL. <http://www.scanco.ch>
- [11] ] Bouza C et al (2007) Hospitalised osteoporotic vertebral fractures in Spain: analysis of the national hospital discharge registry. *Osteoporos Int* 18(5):649–657
- [12] Prevención de la osteoporosis (2009). El coste de la Desinformación del paciente.  
[http://www.economiadelasalud.com/Ediciones/04/pdf/04\\_EnPortada\\_Preencion.Pdf](http://www.economiadelasalud.com/Ediciones/04/pdf/04_EnPortada_Preencion.Pdf)
- [13] Lis Mosekilde *The effect of modelling and remodelling on human vertebral body architecture*, 1988
- [14] *Vertebral Compression Fractures in the Elderly* JERRY L. OLD, M.D., University of Kansas School of Medicine, Kansas City, KansasMICHELLE CALVERT, M.D., Am Fam Physician. 2004 Jan 1;69(1):111-116.



- [15] M Hamady, S Sheard *Role of cementoplasty in the management of compression vertebral body fractures*
- [16] <http://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=vertebro>
- [17] G. BAROUD, M. BOHNER. *Biomechanical impact of vertebroplasty and Postoperative biomechanics of vertebroplasty*. Joint Bone Spine 2005; 73(2):144-150.
- [18] <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753330normalc.html>
- [19] Sarda et al, "*influence of surfactant molecules as airentaineing agent for bone cement macroporosity*" journal of Biomedical Material Research Vol. 65<sup>a</sup> (2) (2003), 215-221
- [20] Harr effect of a protein based foaming agentin a calcium phosphate bone cement, proyecto de fin de carrera 2004 ETSEIB UPC
- [21] LeGeros, R. Z.: Calcium Phosphates in OralBiology and Medicine. Monographs in OralScience, Vol. 15, Ed. H. M. Myers, Karger, Basel, 1991.).
- [22] Amy E. Johnson Æ Tony S. Keller *Mechanical properties of open-cell foam synthetic thoracic vertebrae* Agosto 2006
- [23] <http://www.sawbones.com/>
- [24] Pr J-Y Devaux PPT "l'imagerie en coupes: la tomographie", faulté de medecine Paris V
- [25] <http://www.emcourses.com/sputter.htm>
- [26] <http://bonej.org/>
- [27] Javier Alonso Rodríguez. Departamento de Geología (Petrología y Geoquímica) "Propiedades físicas: densidad y porosidad". Universidad de Oviedo.
- [28] Newton et al, "*Biomechanics pertinent to fracture etiology, reduction and fixation*", Textbook of small animal orthopaedics, cap. 12, J.B. Lippincott Company (1985).
- [29] Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, et al. *Transmenopausal changes in the trabecular bone structure*. Bone 2007;41:111-6.)